

# LIFE GESTIRE 2020

## Nature Integrated Management to 2020

### Azione C18

#### Conservazione ex-situ e reintroduzione di specie vegetali (All. II e IV DH)

### RELAZIONE ATTIVITÀ CENTRO FLORA AUTOCTONA DELLA LOMBARDIA ANNO 2020

A cura di  
Roberta M. Ceriani



CENTRO FLORA AUTOCTONA

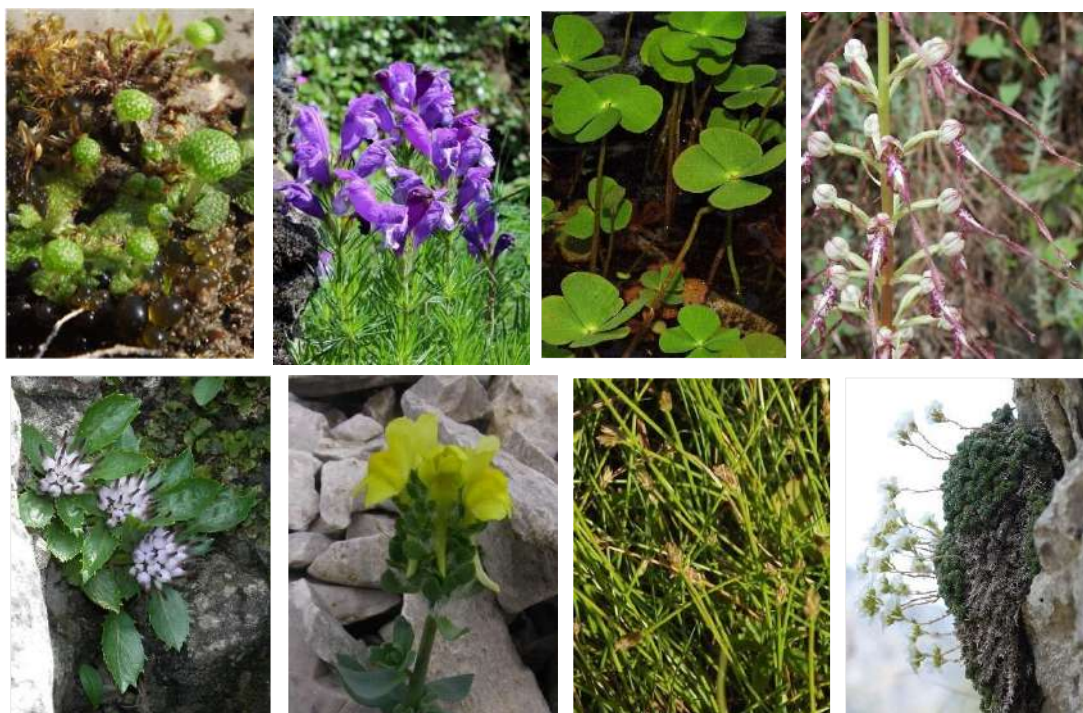
Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia  
Parco Monte Barro  
Via Bertarelli n. 11  
23851 Galbiate (LC)



**PARCO MONTE BARRO**  
Via Bertarelli, 11 ì Galbiate (LC)



**Progetto LIFE IP GESTIRE 2020 - Azione C18**  
**Conservazione ex situ e reintroduzione**  
**di specie vegetali (All. II e IV DH)**



**RELAZIONE ATTIVITÀ DEL CENTRO FLORA**  
**AUTOCTONA DELLA LOMBARDIA**  
**ANNO 2020**

## Indice

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Premessa                                                                          | 2  |
| Attività B - Raccolta del materiale di propagazione in natura                     | 4  |
| Attività C - Conservazione dei semi presso la LSB                                 | 13 |
| Attività D - Messa a punto di protocolli di propagazione                          | 14 |
| Nuovi protocolli                                                                  | 14 |
| Protocolli sviluppati da altri soggetti, ma coordinati dal LIFE                   | 26 |
| Protocolli esistenti oggetto di verifica                                          | 34 |
| Attività E - Propagazione vera e propria con produzione di piante radicate        | 40 |
| Attività F - Verifica della capacità germinativa di <i>Saxifraga tombeanensis</i> | 41 |
| Attività H - Assistenza tecnica e produzione di piante per Display Garden         | 46 |
| Bibliografia                                                                      | 47 |

Allegato A. Protocolli di coltivazione di *Mannia triandra*, *Isoetes malinverniana*, *Marsilea quadrifolia*.

Per evitare confusione, la nomenclatura delle specie rispecchia quella riportata nel Capitolato Tecnico.

La presente relazione è stata redatta con i contributi di (in ordine alfabetico):

Thomas Abeli, Stefano Armiraglio, Jessica Bellingardi, Mario Beretta, Guido Brusa, Marco Caccianiga, Roberta M. Ceriani, Simone Orsenigo, Simon Pierce, Graziano Rossi.

### **Citazione consigliata:**

Ceriani R.M., Abeli T., Armiraglio S., Bellingardi J., Beretta M., Brusa G., Caccianiga M., Orsenigo S., Pierce S., Rossi G., 2020. Conservazione ex situ e reintroduzione di specie vegetali (All. II e IV DH). Relazione tecnica attività CFA 2020. LIFE IP GESTIRE 2020 - Azione C18. Centro Flora Autoctona della Lombardia.

**Foto di copertina**, da sinistra a destra e dall'alto verso il basso:

*Mannia triandra* ì foto G. Brusa; *Dracocephalum austriacum* ì foto F. Mangili; *Marsilea quadrifolia* ì foto G. Parolo; *Himantoglossum adriaticum* ì foto S. Pierce; *Physoplexis comosa* ì foto S. Pierce; *Linaria tonzigii* ì foto A. Ferrario; *Eleocharis carniolica* ì foto G. Brusa; *Saxifraga tombeanensis* ì foto S. Armiraglio.

## Premessa

Il Centro Flora Autoctona della Regione Lombardia (CFA), gestito dal Parco del Monte Barro è stato incaricato da ERSAF tramite procedura SINTEL, di partecipare all'Azione C18 del LIFE IP GESTIRE 2020, relativa alla "Conservazione ex-situ e reintroduzione di specie vegetali (All. II e IV DH)". L'incarico è stato affidato al CFA in virtù dell'esperienza maturata in circa 20 anni di attività nella propagazione *ex situ* di specie autoctone lombarde, nonché nella conservazione del germoplasma presso la Banca del Germoplasma delle Piantе Lombarde (o *Lombardy Seed Bank*, LSB) che del CFA è parte integrante.

Secondo il Capitolato Tecnico associato all'incarico, il CFA, nel periodo 2019-2023, deve procedere allo svolgimento di 10 Attività riguardanti tutte o in parte le 27 specie floristiche incluse negli Allegati II e IV della Direttiva Habitat, presenti in Lombardia. Le 10 Attività possono essere riassunte come segue:

- A) richiesta di autorizzazione al Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare per la raccolta e conservazione del germoplasma e conservazione *ex situ*.
- B) raccolta del materiale di propagazione in natura.
- C) conservazione nelle migliori condizioni di germinabilità degli *stock* raccolti, presso la Banca del Germoplasma delle Piantе Lombarde.
- D) messa a punto di protocolli di propagazione per le specie indicate nella colonna "Protocolli e avvio alla coltivazione" del capitolato tecnico, conservando tutte le piante eventualmente prodotte.
- E) propagazione vera e propria con produzione di piante radicate in vaso.
- F) assistenza tecnica per la verifica della reale capacità germinativa *in situ* di *Saxifraga tombeanensis*.
- G) assistenza tecnica a reintroduzioni e/o rafforzamenti.
- H) assistenza tecnica e produzione di materiale vegetale per la realizzazione di 3 "Display Garden".
- I) collaborazione nella stesura del "Rapporto sui risultati conseguiti con l'Azione C18 per il miglioramento dello stato di conservazione delle specie vegetali".
- J) collaborazione nell'organizzazione nell'ultimo anno di progetto di un *workshop*.

Come consuetudine del CFA, per la realizzazione delle Attività previste, oltre al proprio personale e alle proprie strutture, si è deciso di fare ricorso ad esperti per le singole specie e/o per specifici gruppi tassonomici, afferenti a istituti di ricerca lombardi e/o liberi professionisti, di nota e riconosciuta esperienza. Sono stati pertanto formalmente coinvolti nell'Azione:

- Università degli Studi di Milano - Dip.to di Bioscienze, rif. Prof. Marco Caccianiga, per *Dracocephalum austriacum*
- Università degli Studi di Milano - Dip.to di Scienze Agrarie e Ambientali, rif. Dott. Simon Pierce, per *Himantoglossum adriaticum* e *Liparis loeselii*
- Università degli Studi di Pavia - Dip.to di Scienze della Terra e dell'Ambiente, rif. Prof. Graziano Rossi, per *Marsilea quadrifolia* ed *Isoetes malinverniana*
- Museo Civico di Scienze Naturali - Comune di Brescia, rif. Dott. Stefano Armiraglio, per *Saxifraga tombeanensis*
- Dott. Biol. Guido Brusa, libero professionista ed esperto briologo, per *Buxbaumia viridis*, *Dicranum viride*, *Hamatocaulis vernicosus*, *Mannia triandra*, *Riccia breidlerii*.

Nei paragrafi che seguono viene descritto quanto svolto nel secondo anno relativamente alle Attività B, C, D, E, F, H. Per quanto riguarda l'Attività A, le autorizzazioni acquisite e/o rilasciate ai collaboratori nel 2019 restano valide fino al termine della collaborazione nel 2023. Le restanti Attività saranno avviate nei prossimi anni e/o sono già esplicitamente previste per l'ultima fase di progetto.

Anche nel 2020, pur non essendo prevista un'Attività specifica dedicata alla divulgazione, il personale del CFA e/o i collaboratori esperti sopra citati hanno partecipato alle iniziative divulgative organizzate e segnalate dal committente ERSAF. In particolare si segnala la partecipazione al Networking Meeting del progetto LIFE Orchids in data 19 giugno 2020, durante il quale Simon Pierce e Roberta M. Ceriani hanno contribuito alla presentazione a cura della Dott.ssa Patrizia Digiovinazzo, con la preparazione delle *slides* relative alla distribuzione lombarda e alla propagazione *ex situ* delle orchidee *Cypripedium calceolus*, *Himantoglossum adriaticum*, *Liparis loeselii*, *Spiranthes aestivalis*. La partecipazione della Dott.ssa Roberta M. Ceriani alla discussione *post-meeting* ha permesso di approfondire con gli organizzatori e i relatori rimasti i seguenti aspetti:

- ruolo e individuazione dei custodi delle orchidee e/o dei prati con particolare riferimento alla situazione lombarda (azione gestita dal partner Legambiente Lombardia);
- propagazione *ex situ* delle orchidee con particolare riferimento alla micorizzazione dei protocormi.

L'attività prevista per il 2020 è stata influenzata dall'emergenza sanitaria legata alla **pandemia da Covid 19**, con particolare riferimento al periodo di *lockdown* nella prima parte dell'anno e alle limitazioni negli spostamenti nel successivo autunno. Questa situazione ha penalizzato soprattutto la sperimentazione nella propagazione *ex situ*, con riduzione della possibilità di monitoraggio delle prove già avviate con la cadenza consueta (l'accesso ai laboratori era consentito solo in date prestabilite per evitare assembramenti, oppure completamente precluso), come pure di avviare le nuove prove già programmate. Anche l'attività di campo ha subito effetti negativi, impedendo la realizzazione di sopralluoghi diluiti nel tempo già a partire dalla primavera, e obbligando a condensare poche uscite mirate in un periodo più breve. Nei testi che seguono, laddove necessario vengono indicate in modo sintetico le azioni che sono state compromesse, posticipate e/o alterate a causa della pandemia.



## Attività B - Raccolta del materiale di propagazione in natura

Anche nel secondo anno di attività, il personale del CFA così come ciascuno degli esperti delle singole specie e/o dei gruppi di specie, ha curato direttamente la raccolta del materiale di propagazione, differenziato a seconda dei taxa considerati. Come detto nel 2020 l'acquisizione del germoplasma è stata condizionata almeno in parte dall'emergenza Covid 19, a causa delle limitazioni negli spostamenti e/o periodi di quarantena.

Per quanto riguarda le **Briofite**, non si è provveduto alla raccolta di nuovo materiale vegetale, in quanto il materiale in precedenza acquisito e quindi propagato *ex situ* nel 2019 è risultato sufficiente per continuare la sperimentazione.

Anche per le **Pteridofite**, *Isoetes malinverniana* e *Marsilea quadrifolia* l'attività sperimentale è proseguita utilizzando il materiale riproduttivo disponibile presso il Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Pavia sotto la supervisione del Prof. Graziano Rossi e del Dott. Simone Orsenigo.

Per quanto riguarda le **Spermatofite gestite direttamente dal CFA**, sono stati complessivamente acquisiti 13 lotti di semi appartenenti a 7 specie, riferite a complessive 11 località. In Tabella 1 si riportano i dettagli dei lotti campionati, evidenziando anche le quantità in peso e una stima del numero di semi disponibili.

Particolare difficoltà è stata riscontrata nell'individuazione dei semi di *Daphne petraea*: lo stesso e la dissezione delle corolle secche raccolte in località Tremalzo in una popolazione indicata dal tecnico ERSAF Vincenzo Ghidotti, ha permesso di individuare allo stereomicroscopio le caratteristiche drupe scarsamente pubescenti. Purtroppo dall'osservazione di oltre 0,22g di corolle secche è stato possibile ottenere solo 0,0026g corrispondenti ad esattamente 20 semi: molte delle corolle sono infatti risultate vuote.

Tabella 1: Lotti di semi acquisiti dal CFA nella stagione vegetativa 2020.

| Taxon                  | LOCALITÀ<br>RACCOLTA     | ANNO<br>RACCOLTA | peso lotto<br>(g) | stima n°<br>semi |
|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| Daphne petraea         | Tremosine (BS)           | 2020             | 0,0026            | 20               |
| Gladiolus palustris    | Monte Barro (LC)         | 2020             | 1,7075            | 812              |
| Gladiolus palustris    | Sasso Malascarpa (LC)    | 2020             | 0,7560            | 561              |
| Linaria tonzigii       | Pizzo Arera (BG) lotto A | 2020             | 0,7870            | 1.871            |
| Linaria tonzigii       | Pizzo Arera (BG) lotto B | 2020             | 0,0776            | 103              |
| Physoplexis comosa     | Bellagio (CO)            | 2020             | 0,1805            | 2.608            |
| Physoplexis comosa     | Tremalzo (BS)            | 2020             | 1,6977            | 24.533           |
| Primula glaucescens    | Grigne (LC)              | 2020             | 5,7055            | 18.993           |
| Primula glaucescens    | Pizzo Arera (BG)         | 2020             | 2,4400            | 9.017            |
| Primula spectabilis    | Tremalzo (BS) lotto A    | 2020             | 1,2460            | 4.842            |
| Primula spectabilis    | Tremalzo (BS) lotto B    | 2020             | 13,3840           | 52.010           |
| Saxifraga tombeanensis | Cadria (BS)              | 2020             | 0,0793            | 2.609            |
| Saxifraga tombeanensis | Corna Rossa (BS)         | 2020             | 0,3133            | 8.198            |

Un'altra difficoltà riscontrata nel corso della raccolta del germoplasma ha riguardato la specie *Saxifraga presolanensis*. In questo caso la ricerca delle popolazioni segnalate in passato sul Monte Arera e nell'area della Presolana non sono state rinvenute e pertanto non è stato possibile ottenere materiale di propagazione. Nella stagione 2021 sarà programmata una campagna molto più approfondita per verificare la presenza della specie nelle località indicate nel database floristico dell'Osservatorio per la Biodiversità di Regione Lombardia.

Anche nel caso di *Gladiolus palustris* si sono osservate alcune problematiche legate al reperimento del germoplasma. Nel corso della stagione 2020 è stata in particolare monitorata la popolazione già segnalata in passato sul Sasso Malascarpa, e confermata con l'osservazione di 66 individui in fiore tra il 6 e il 21 luglio 2020 (Ferrario, comm. pers.); successivi sopralluoghi da parte del personale CFA, hanno permesso di rilevare la medesima popolazione in frutto, ma la maggior parte delle capsule è risultata oggetto di forte predazione con pochissimi semi maturi e integri (v. Figura 1). Questi ultimi sono stati comunque raccolti, come pure quelli presenti in alcune capsule immature, avendo cura di non esaurire comunque tutta la disponibilità di semi presenti in natura per garantire il rinnovamento della popolazione. I semi sono stati fatti maturare e quindi trattati come di consueto. Tuttavia il peso medio dei semi di *Gladiolus palustris* raccolti sul Sasso Malascarpa è risultato significativamente inferiore rispetto a quello dei semi della stessa specie raccolti sul Monte Barro nel medesimo periodo (*t*-test di Student:  $p < 0.0001$ ; dati non mostrati). La vitalità dei semi di entrambe le popolazioni sarà valutata mediante test di germinazione.



Figura 1: Capsule di *Gladiolus palustris* campionate in località Sasso Malascarpa con evidenti segni di predazione (foto S.Pierce; 11/08/2020).

Infine, il lotto *Physoplexis comosa* ĩ Tremalzo (BS) include circa un terzo di materiale raccolto prima della completa maturazione, come testimoniato dalla presenza di infiorescenze con corolle integre secche (Figura 2). Per questa frazione la maturazione dei semi è presumibilmente avvenuta dopo il distacco dalla pianta madre, durante la fase di essiccazione post raccolta, prima della consegna alla LSB. Questi semi sono ora presenti nel lotto e risultano indistinguibili da quelli maturati sulla pianta madre, derivanti da capsule già chiaramente prive della corolla. Non è noto se questo tipo di maturazione post-raccolta possa influenzare le *performances* germinative in *Physoplexis comosa*.



Figura 2: Materiale essiccato riferito al lotto *Physoplexis comosa* ĩ Tremalzo (BS): le corolle risultano ancora presenti e i semi sono probabilmente maturati solo dopo il distacco dalla pianta madre (v. testo per dettagli; foto R.M. Ceriani).

Per quanto riguarda *Dracocephalum austriacum*, le attività di propagazione sono seguite come detto dal Dip.to di Bioscienze, sotto la supervisione del Prof. Marco Caccianiga e si sono focalizzate all'inizio del progetto su semi e piante provenienti da una precedente raccolta effettuata il 18 luglio 2016 nella stazione svizzera di Ardez. Tale stazione era stata prescelta per una valutazione preliminare di un protocollo di germinazione della specie, in quanto più ricca di individui (oltre 500) rispetto a quelle italiane note. Il prelievo era stato effettuato con l'autorizzazione e sotto il controllo dell'Ufficio per l'Ambiente e la Natura Svizzero (Angelika Abderhalden).

In data 6 Agosto 2020 è stata compiuta una visita alla stazione lombarda di *Dracocephalum austriacum*. Erano state previste più visite nel corso della stagione primaverile-estiva per monitorare la fenologia della popolazione, ma l'emergenza sanitaria da Covid 19 ha impedito l'attività di campo nel periodo previsto, in seguito alle restrizioni al lavoro sperimentale decise dall'Amministrazione dell'Ateneo e del Dipartimento di Bioscienze. Oltre a precludere la visita nel periodo di fioritura e a causare la probabile perdita della prima parte della dispersione dei semi, l'emergenza sanitaria ha anche pesantemente limitato l'attività in Orto Botanico nei mesi di Marzo-Maggio 2020, con una frequentazione ridotta al solo mantenimento dei servizi essenziali, anche a causa dell'isolamento domiciliare subito dal Prof. Marco Caccianiga.

L'uscita del 2020 era finalizzata oltre che all'eventuale campionamento del germoplasma anche alla valutazione dello stato di salute dell'unica popolazione lombarda di questa specie. La popolazione, presente in comune di Livigno a circa 2000m di quota, è sparsamente distribuita sui detriti di pendii molto acclivi a ridosso delle pareti in destra idrografica del Canal Torto. Durante il monitoraggio sono state conteggiate una sessantina di piante in buona salute (Figura 3), ma di queste solo due piante presentavano capsule ben formate. Le restanti piante non presentavano tracce di fioriture o fruttificazioni pregresse. In mancanza di monitoraggio nel periodo di fioritura, non è possibile stabilire se si tratti di un generale fenomeno di bassa produzione di fiori o se la stagione ormai avanzata abbia portato alla perdita di buona parte degli steli fiorali. Vista la bassissima presenza di strutture riproduttive, per limitare il più possibile un eventuale danno alla popolazione, sono state raccolte solo 8 capsule.

Le capsule raccolte hanno presentato un basso grado di fertilità, consentendo la raccolta di solo 5 semi maturi (Figura 4). Tale basso numero di semi può essere imputato a un basso tasso di fertilità e quindi un basso rapporto ovuli/semi vista la presenza di 16 semi abortiti (Figura 4). Non essendo stato possibile valutare le fasi fenologiche dalla fioritura alla maturazione dei semi, non è possibile stabilire con certezza le cause di tale fenomeno. Il generale basso numero di steli fioriferi osservati, che avrebbero dovuto essere ancora visibili seppur secchi, fa propendere per un anno di generali sfavorevoli condizioni per la riproduzione di *Dracocephalum austriacum*. I semi raccolti sono stati stoccati a 4°C secondo le procedure sperimentate per i semi della stazione di Ardez. Visto il bassissimo numero, non è possibile utilizzarli per la stesura di un protocollo di germinazione.



Figura 3. Individui di *Dracocephalum austriacum* nella stazione lombarda (foto M. Beretta).



Figura 4: Semi raccolti dalle 8 capsule di *Dracocephalum austriacum*. A sinistra i 5 semi completamente sviluppati (foto M. Beretta)

Per quanto riguarda le **Orchidee**, si descrive di seguito quanto effettuato per le singole specie oggetto di studio.

Per quanto riguarda *Cypripedium calceolus*, l'impollinazione manuale è stata effettuata solo in una popolazione (Figura 5 A e B), e dopo 49 giorni si è provveduto alla raccolta di 8 frutti (Figura 5C), subito trasferiti in laboratorio per la semina il giorno successivo (v. Attività D). Ulteriori controlli nelle altre popolazioni lombarde hanno confermato la presenza della specie, ma con individui ancora in bocciolo (Figura 6A) e/o individui giovanili immaturi privi di fiori (Figura 6B), senza possibilità di effettuare l'impollinazione manuale. I semi raccolti sono comunque risultati sufficienti per le attività di sperimentazione.



Figura 5: *Cypripedium calceolus*: A: pianta in piena fioritura (10/6/2020; foto G.J. Pierce); B: pollinio prelevato per l'impollinazione manuale (10/6/2020; foto S. Pierce); C: un frutto pronto per la raccolta 49 giorni dopo l'impollinazione (28/7/2020; foto S. Pierce).



Figura 6: *Cypripedium calceolus*: A: piante in bocciolo e B: piante immature (16/6/2020; foto S. Pierce).

Nel corso del 2020 sono state monitorate le medesime 3 popolazioni di *Himantoglossum adriaticum* individuate nel 2019, ma in nessuna di queste è stato possibile raccogliere semi per i seguenti motivi:

- popolazione di Esmate - Solto Collina (BG): l'unica pianta presente non è stata rinvenuta;
- popolazione di Gorlago (BG): il prato dove il gruppo di piante è presente è stato tagliato in maggio con distruzione delle infiorescenze (Figura 7 A);
- popolazione di Forte Garibaldi (BS): tutti i frutti rinvenuti sono stati distrutti dall'erbivoria prima della maturazione dei semi (Figura 7B e C).



Figura 7: *Himantoglossum adriaticum*: A: prato di Gorlago (BG) tagliato prima della fioritura delle piante in maggio (3/6/2020); B e C: individui con infiorescenze distrutte dall'erbivoria e totale assenza di frutti nella popolazione di Forte Garibaldi (BS; 3/6/2020; foto S. Pierce).

Per quanto riguarda *Liparis loeselii*, nel 2020 la popolazione ubicata ai Piani di Nesso (CO) ha mostrato un alto tasso di erbivoria, con conseguente distruzione o danneggiamento delle infiorescenze senza produzione di semi (Figura 8 A e B). Nella popolazione di Porto Mantovano (MN) nel 2020 sono fiorite solo 3 piante di *L. loeselii*, ma una mostrava sin dall'inizio danni da erbivoria, con distruzione dell'infiorescenza. Anche nei successivi controlli, sulle piante rimanenti erano evidenti segni di erbivoria sulle foglie e soprattutto sulle capsule, in alcuni casi con esposizione dei semi all'atmosfera (Figura 8 C). Nonostante la situazione, è stato comunque possibile raccogliere un totale di 10 frutti, lasciandone 6 in situ per garantire una possibilità di riproduzione naturale.



Figura 8: *Liparis loeselii*: A e B: danni da erbivoria sulle piante della popolazione dei Piani di Nesso (CO; 19/6/2020); C: frutti maturi in un individuo della popolazione di Porto Mantovano, con evidenti segni di predazione (v. riquadro; 10/9/2020); D: frutti immaturi nella popolazione di Porto Mantovano (5/8/2020; foto S. Pierce).

Nell'unica popolazione lombarda nota di *Spiranthes aestivalis* sono stati individuati nel 2020 tre gruppi di piante per un totale di 230 individui (1/7/2020). Il monitoraggio finalizzato alla raccolta dei semi è stato effettuato soprattutto nel gruppo più grande costituito da 145 individui fioriti. Tuttavia, soltanto 16 di questi hanno prodotto frutti maturi con semi fertili ovvero il 7% del totale). Il basso tasso di produzione di semi è dovuto alla mancanza di impollinazione (ovari sottosviluppati), associata a danni da erbivoria (infiorescenze parzialmente distrutte). Dai 16 individui di cui sopra, è stato comunque possibile campionare semi un mese dopo la fioritura (Figura 9).



Figura 9: *Spiranthes aestivalis*: A: piante con frutti, e B: frutti maturi al momento della raccolta semi (5/8/2020; foto S. Pierce).

## Attività C i Conservazione dei semi presso la LSB

L'Attività C prevede la conservazione nelle migliori condizioni di germinabilità degli stock raccolti presso la Banca del Germoplasma delle Piante Lombarde (Lombardy Seed Bank, LSB), secondo la procedura standard con congelamento dei semi essiccati suddivisi nei duplicati Active e Base, identificati con codice univoco e inseriti in congelatori distinti.

Come per il 2019, i semi raccolti nel 2020 sono destinati per lo più alla sperimentazione per la definizione dei protocolli di coltivazione (v. Attività D).

In questa sede pare opportuno evidenziare che un riordino dei vecchi database della LSB e successivi conferme da parte dei Royal Botanic Gardens di Kew (UK), hanno permesso di accertare la presenza di lotti di semi di specie inserite negli allegati della Direttiva Habitat e donati nel 2003, 2004 e 2005, prima e durante l'istituzione della LSB stessa, alla Millennium Seed Bank (MSB) per la conservazione a lungo termine (Tabella 2): questi lotti si aggiungono a quelli storici della LSB secondo quanto comunicato con la relazione dell'anno 2019, e costituiscono un'ulteriore risorsa di germoplasma a disposizione in caso di problemi conservazionistici. L'accordo di donazione siglato dal Parco del Monte Barro prevede infatti che i semi non possano essere ceduti a terzi, e debbano essere restituiti in caso di necessità e/o ricerca scientifica.

Tabella 2: Lotti di semi donati dal Parco del Monte Barro alla Millennium Seed Bank (MSB) dei Royal Botanic Gardens di Kew (UK), dove risultano tuttora conservati.

| Taxon                   | ID_LSB | ID_MSB | ANNO<br>RACCOLTA |
|-------------------------|--------|--------|------------------|
| Adenophora liliifolia   | BS 003 | 203579 | 2003             |
| Adenophora liliifolia   | BS 004 | 203580 | 2003             |
| Cypripedium calceolus   | SO 028 | 202974 | 2003             |
| Linaria tonzigii        | BG 041 | 203683 | 2003             |
| Physoplexis comosa      | LC 045 | 202712 | 2003             |
| Primula glaucescens     | BG 048 | 202686 | 2003             |
| Primula glaucescens     | BG 095 | 207142 | 2003             |
| Primula glaucescens     | LC 049 | 202664 | 2003             |
| Primula spectabilis     | BS556  | 517050 | 2005             |
| Saxifraga presolanensis | BG 051 | 202918 | 2003             |
| Saxifraga tombeanensis  | BS118  | 517027 | 2004             |

## Attività D - Messa a punto di protocolli di propagazione

Il Capitolato Tecnico di incarico prevede per l'attività di messa a punto di protocolli di coltivazione, una diversificazione a seconda delle specie considerate, individuando le seguenti 3 categorie:

- Nuovi protocolli e avvio alla coltivazione: *Hamatocaulis vernicosus*, *Mannia triandra*, *Riccia breidleri*; *Isoetes malinverniana*, *Marsilea quadrifolia*; *Dracocephalum austriacum*, *Eleocharis carniolica*, *Himantoglossum adriaticum*, *Liparis loeselii*, *Saxifraga presolanensis*.
- Protocolli sviluppati da altri soggetti, ma coordinati dal LIFE: *Primula spectabilis*, *Gladiolus palustris*, *Cypripedium calceolus*, *Spiranthes aestivalis*.
- Protocolli di germinazione esistenti, ma da verificare ai fini dell'ottenimento di piante adatte ad interventi di reintroduzione (Attività E e H), nonché per il controllo della vitalità dei semi conservati in LSB (Attività C): *Linaria tonzigii*, *Physoplexis comosa*, *Primula glaucescens*.

Tale suddivisione viene mantenuta nei paragrafi che seguono.

### Nuovi protocolli

Nel corso del 2020 si è conclusa la sperimentazione riferita alle specie ***Mannia triandra***, ***Isoetes malinverniana*** e ***Marsilea quadrifolia***. I protocolli di coltivazione definitivi per queste specie sono riportati in Allegato A. Si evidenzia che in tali documenti sono presenti informazioni e dati sensibili la cui ampia divulgazione può compromettere la sopravvivenza delle specie in natura, in quanto riguardanti il prelievo del materiale di propagazione nelle popolazioni naturali. Il personale del CFA di comune accordo con gli esperti delle singole specie e/o dei specifici gruppi tassonomici, ha pertanto deciso di evidenziare tali informazioni con carattere in **grassetto di colore rosso**, in modo tale che sia possibile un facile controllo e un'eventuale omissione nelle successive fasi di divulgazione.

Per le rimanenti specie si descrive di seguito lo sviluppo dell'attività di propagazione sperimentale.

### Briofite

#### ***Hamatocaulis vernicosus***

Per il muschio *Hamatocaulis vernicosus*, nel 2020 si è affinata la tecnica di coltivazione messa a punto l'anno precedente. Questa attività è avvenuta mediante la comparazione con la coltivazione di altre specie di *brown mosses* (*Paludella squarrosa* e *Meesia triquetra*), altrettanto rare a livello nazionale e con esigenze ecologiche simili a quelle di questo muschio. In alternativa alla torba commerciale, è stato sperimentato l'impiego di un substrato di crescita alternativo e in maggior misura ecologicamente sostenibile: la fibra di cocco. I risultati di questa sperimentazione hanno consentito di verificare come la fibra di cocco, anche se miscelata con la torba, non rappresenta un substrato ottimale per la propagazione (Figura 10). Inoltre, si ottengono risultati simili con o senza una riserva d'acqua sotto il contenitore di crescita; la coltivazione senza riserva d'acqua pone comunque meno problemi di gestione se il contenitore è ben riparato dalle precipitazioni atmosferiche. Tuttavia, la crescita sul medesimo substrato torboso diminuisce già dal secondo anno di

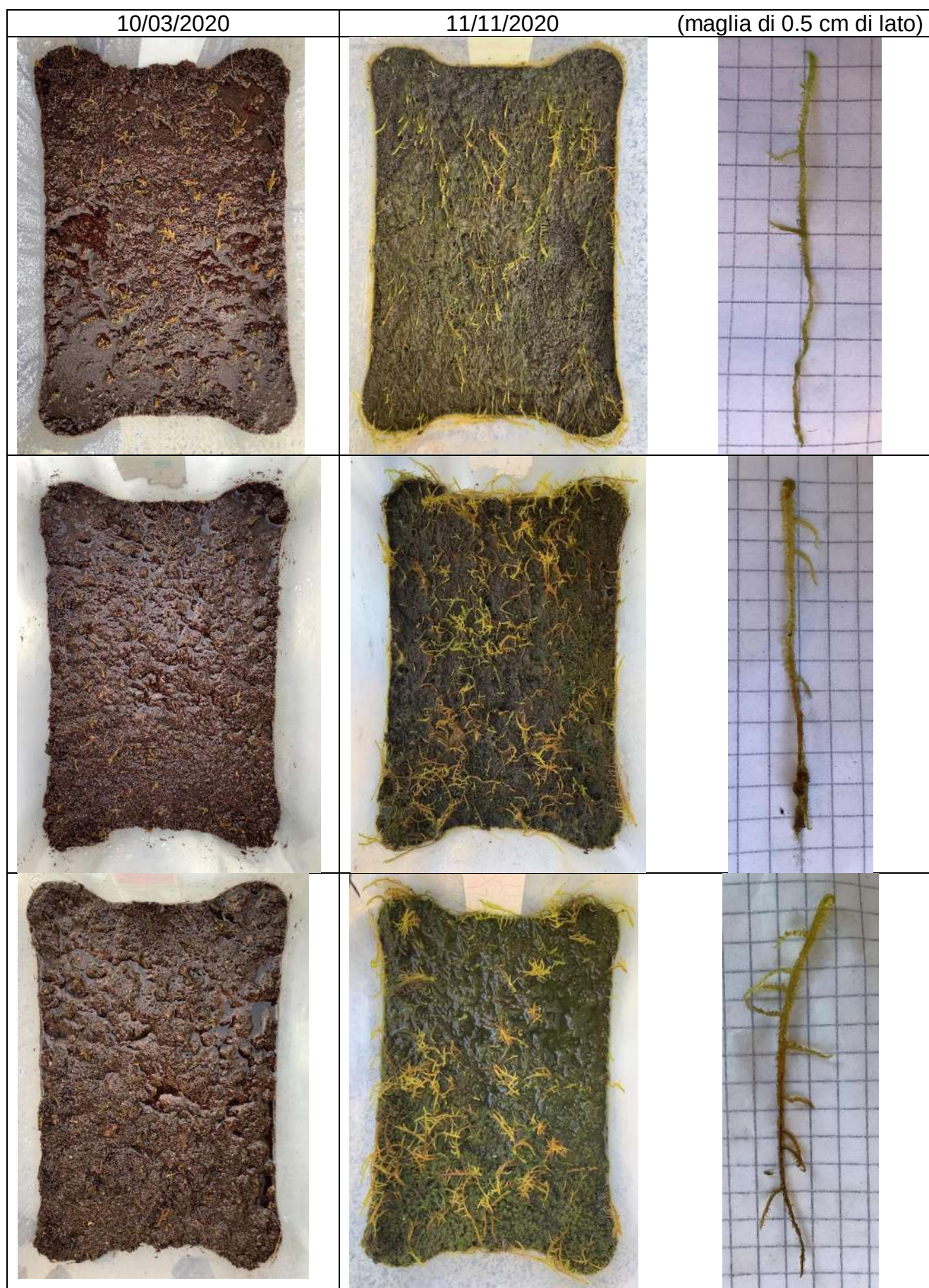


Figura 10: Prove di coltivazione per *Hamatocaulis vernicosus* su diversi tipi di substrato: in alto, fibra di cocco; al centro, miscela al 50% tra fibra di cocco e torba; in basso, torba (foto G. Brusa).

coltivazione; di conseguenza, è consigliabile far ripartire la propagazione la primavera successiva a quella del primo impianto o comunque non prostrarla oltre il secondo anno. In condizioni ottimali, partendo da frammenti di ca. 5-10 mm, è possibile ottenere una crescita in media di  $7,4 \pm 0,8$  cm (periodo inizio marzo-inizio novembre). Non è stata mai osservata la produzione di gametangi.

### ***Riccia breidleri***

Per questa epatica, è proseguita la sperimentazione. Nello specifico si è verificata la riproduzione da spore, senza esito positivo. Allo stato attuale, la riproduzione vegetativa da frammenti di tallo con apice vegetativo sembra essere quindi la tecnica più idonea per la coltivazione *ex situ* di questa specie. Se vengono costantemente mantenuti in condizioni ideali di crescita, i talli che si sviluppano da questi frammenti mostrano una divisione esponenziale in termini di nuovi apici vegetativi prodotti. Più precisamente, in un arco temporale di 140 giorni di coltivazione, da singoli apici vegetativi si sono ottenuti in media talli con  $63 \pm 21$  nuovi apici vegetativi. Nello stesso periodo, i talli hanno avuto due periodi di sporificazione, con la maturazione delle spore avvenuta in giugno e quindi in settembre (Figura 11).

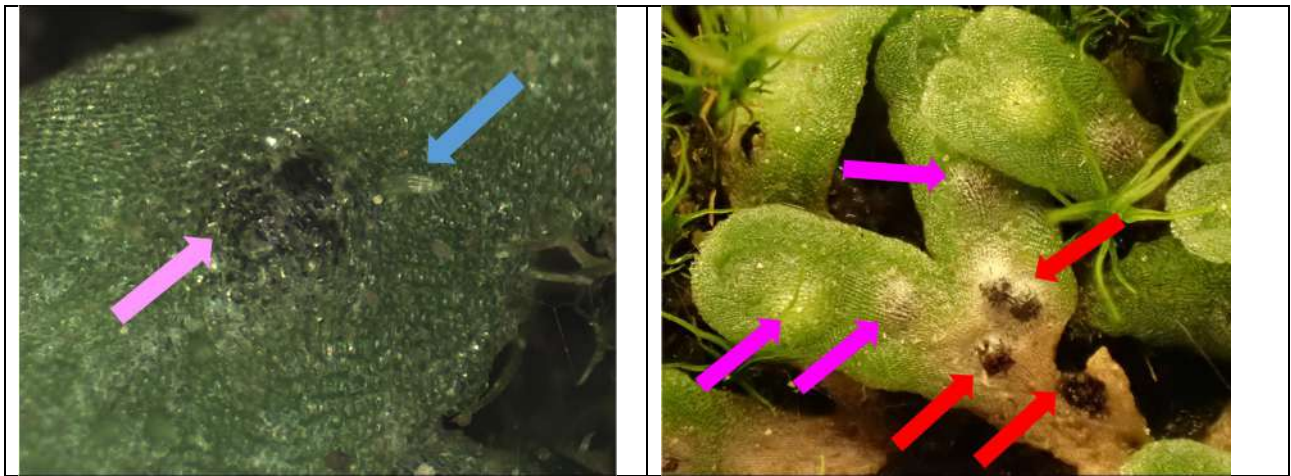


Figura 11: Fasi di riproduzione sessuale in *Riccia breidleri*: a sinistra, archegonio (freccia rosa) e anteridio (freccia azzurra) presenti a fine agosto; a destra, prima (freccie rosse) e seconda (freccie fucsia) generazione di sporofiti (capsule) presenti contemporaneamente a settembre (foto G. Brusa).

## Spermatofite

### *Dracocephalum austriacum*

Come già accennato, nel corso del presente progetto si è proceduto al monitoraggio delle piante derivanti dalla prima semina (Ottobre-Novembre 2016) e alla semina ex novo (21 Maggio 2020) di uno stock di 83 semi provenienti dalla stessa raccolta effettuata il 18 luglio 2016 nella stazione svizzera di Ardez. I semi allora raccolti sono stati in parte destinati alla conservazione a 4°C, in parte vernalizzati a 4°C per 35 giorni, e in parte non vernalizzati, secondo la tabella seguente:

| Vernalizzati | Non vernalizzati | Conservati | TOT |
|--------------|------------------|------------|-----|
| 90           | 90               | 83         | 262 |

180 semi sono stati seminati in tre ambienti diversi: serra tropicale umida (T minima 16°C, fotoperiodo costante di 14 h di luce), serra asciutta (T minima 7,5°C, fotoperiodo naturale), esterno. Il terreno per la semina è stato ideato per riprodurre le caratteristiche ottimali di crescita di *D. austriacum*, pertanto è diviso in proporzioni uguali di perlite, sepiolite (basica) e terriccio universale (torba acida + perlite, lievemente acido: pH=6). In questo modo è stato ottenuto un terreno ad elevato drenaggio (grazie a perlite e sepiolite), di pH leggermente basico (per riprodurre il terreno calcareo). I semi non vernalizzati sono stati seminati il 25 Ottobre 2016, quelli vernalizzati il 29 Novembre 2016.

Dei 180 semi seminati, dopo 100 giorni il tasso di germinazione più alto è stato raggiunto nella serra tropicale, dove sono germogliati 12 dei 30 semi non vernalizzati (il 40%). I semi non vernalizzati posti nella serra asciutta hanno prodotto un simile risultato: sono germinati 11 semi su 30, ossia il 36,67% di essi. Nelle stesse serre, i semi vernalizzati hanno raggiunto percentuali di germinazione minori: il 26,67% nella serra tropicale e appena il 6,67% nella serra asciutta. Il tasso più basso è stato riscontrato nei vasi posti all'esterno: sono germogliati solo 2 semi non vernalizzati (6,67%) e nessuno dei semi vernalizzati. I tempi di germinazione sono variati tra 15 gg (semi vernalizzati, serra tropicale) e 64 gg (esterno). Tuttavia, ad eccezione dei semi vernalizzati nella serra tropicale, tutti gli altri semi non hanno germinato prima di 25 giorni.

All'inizio del presente progetto è proseguito il monitoraggio degli individui ormai adulti ottenuti con le semine del 2016 per valutarne le esigenze ecologiche, l'eventuale fioritura, i patogeni e le condizioni di crescita in Orto. La specie ha mostrato una elevata mortalità delle plantule nelle fasi di acclimatazione. Questo rappresenta un limite alla semina in ambienti protetti (serra) che sembrano garantire tassi elevati di germinazione ma anche maggior mortalità.

Una volta acclimatati, gli individui adulti attraversano periodiche fasi di buon accrescimento (Figura 12) e di crisi con perdita talora totale della parte aerea. Determinante risulta la presenza di ristagno d'acqua, che non è tollerato neanche per brevi periodi. Questo comporta la necessità di monitorare le piante in corrispondenza degli eventi piovosi, soprattutto primaverili, rimuovendo i sottovasi. Di contro, coerentemente con l'habitat di origine, la specie tollera bene anche in coltivazione, temperature estive e relativi momenti di aridità. Nella crescita in ambiente esterno è stata notata una spiccata appetibilità della specie da parte delle lumache, che hanno causato la perdita di numerosi individui. Si è reso necessario l'utilizzo di un lumachicida (esche repellenti, ZAPI) poiché le piante sono state più volte danneggiate.



Figura 12: Plantule di *Dracocephalum austriacum* in diverso stadio di sviluppo in ambiente controllato (serra riscaldata; foto M. Beretta e M. Caccianiga).

A Novembre 2020, solo 3 individui della semina originale erano ancora in vita, pur se in buone condizioni di salute e di rigoglio vegetativo, sebbene in procinto di entrare in quiescenza invernale (Figura 13).

La fioritura, che si era verificata su più individui nel 2018, è avvenuta nel 2019 per un solo individuo della semina originale (Figura 14). Gli individui giovanili non fioriscono fino al secondo anno di vita. La fioritura non ha portato alla formazione di semi. Nel 2020 non vi sono state fioriture.

A completamento della sperimentazione sopra descritta, come già detto, il 21 maggio 2020 gli 83 semi provenienti dalla stazione di Ardez (CH) e raccolti nel 2016, sono stati seminati in serra climatizzata ( $21^{\circ}\text{C} < T < 25^{\circ}\text{C}$ ). L'andamento delle germinazioni è riportato in Tabella 3. Il tasso di germinazione al 30/11/2020 risulta pari al 12,05%. È interessante osservare come le germinazioni siano avvenute anche nel mese di Novembre, con l'ultima plantula emersa il 30 Novembre 2020 (Figura 15).

Tabella 3. Andamento della germinazione dei semi di *Dracocephalum austriacum* della popolazione di Ardez seminati il 21/05/2020 (83 semi)

| DATA       | N. PIANTE | % GERMINAZIONE |
|------------|-----------|----------------|
| 30/06/2020 | 3         | 3,61           |
| 3/07/2020  | 4         | 4,82           |
| 22/07/2020 | 5         | 6,02           |
| 3/08/2020  | 6         | 7,23           |
| 8/10/2020  | 8         | 9,64           |
| 30/11/2020 | 10        | 12,05          |



Figura 13: Aspetto delle piante di *Dracocephalum austriacum* derivanti dalla semina 2016 e osservate nel mese di Novembre 2020 (foto M. Beretta).



Figura 14. Individuo di *Dracocephalum austriacum* in fioritura (foto M. Beretta).

Il sostanziale fallimento della raccolta di semi della stazione lombarda di *Dracocephalum austriacum*, legato sia alle limitazioni alle uscite su campo imposte dall'emergenza sanitaria, che alle probabili condizioni climatiche sfavorevoli per l'anno 2020, non ha consentito la stesura di un protocollo di germinazione sviluppato ad hoc.

Utili indicazioni si sono potute ottenere dal monitoraggio dei semi raccolti nel corso del 2016 nella stazione di Ardez (CH), pur non provenendo da un piano di sperimentazione organicamente e specificamente sviluppato, in quanto i semi messi a dimora nel corso del presente progetto sono comunque vecchi di 4 anni.

È possibile comunque concludere che il tasso di germinazione osservato è relativamente alto (intorno al 40% per le prime semine e al 12% per le seconde, con l'emergenza delle plantule non ancora terminata). La vernalizzazione causa un'accelerazione della germinazione senza influenzare in modo evidente il successo finale (nel primo esperimento sono emerse più piante non vernalizzate), così come le condizioni ambientali che sembrano influire prevalentemente sulla velocità di germinazione. La mortalità è molto elevata, in particolare in condizioni di temperatura e soprattutto di umidità elevata, mentre è buona la tolleranza ad episodi di siccità. La specie è particolarmente appetita dagli erbivori, in particolare lumache, che causano danni estesi. Il seme sembra conservare la sua vitalità per più anni stoccato a 4°C, sebbene ciò sarà pienamente valutabile solo al termine della germinazione delle plantule della seconda semina. La fioritura avviene dal secondo anno di età; la mancata produzione di semi può essere dovuta alla mancanza di insetti pronubi.

Tutte queste indicazioni vanno approfondite e tarate sulla specificità della popolazione lombarda. Visto il basso numero di semi a disposizione, si suggerisce di valutare la possibilità di attendere una raccolta di semi, auspicabilmente più ricca, per il 2021, per poter disporre di un quantitativo che renda possibili analisi più significative.



Figura 15: Plantula di *Dracocephalum austriacum* emersa il 30 Novembre 2020 (foto M. Beretta).

### ***Eleocharis carniolica***

Nel corso del 2020 la sperimentazione su *Eleocharis carniolica* ha riguardato innanzitutto la verifica delle condizioni ottimali del substrato di germinazione *in vitro* in condizioni di sterilità, utilizzando parte dei semi campionati nel 2019 in località Besnate (VA). Si è trattato in assoluto del primo test noto sui semi di questa specie ed è stato finalizzato principalmente alla definizione delle procedure per la sterilizzazione superficiale dei semi. Questo trattamento è necessario per impedire lo sviluppo nel terreno di coltura dei microrganismi già presenti sul tegumento del seme. Tali microrganismi, nelle condizioni artificiali ricreate *in vitro*, tendono infatti a proliferare compromettendo la germinazione dei semi e/o lo sviluppo delle plantule. La definizione delle modalità di sterilizzazione del tegumento del seme costituisce una fase sperimentale critica, poiché un'esposizione e/o una concentrazione troppo elevate all'ipoclorito di sodio possono causare una rottura del tegumento stesso con conseguente danneggiamento dell'embrione fino a comprometterne la vitalità. Più precisamente le prove hanno riguardato la concentrazione e il tempo di esposizione ad ipoclorito di sodio, considerando le varie combinazioni dei seguenti parametri:

| Concentrazione % | Tempo di esposizione |
|------------------|----------------------|
| 5%               | 5 minuti             |
| 10%              | 10 minuti            |
|                  | 15 minuti            |
|                  | 30 minuti            |

Una volta sterilizzati in superficie, i semi sono stati seminati *in vitro* in condizioni di sterilità in piastre Petri su di un substrato di coltura come da seguente tabella:

| Ingrediente                     | Quantità                                                 |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Agar                            | 7 g/l                                                    |
| Saccarosio                      | 20 g/l                                                   |
| Sali Murashige and Skoog (1962) | 2,150 g/l (=mezza forza)                                 |
| Carbone attivo                  | 0,5g/l                                                   |
| GA3                             | 250 mg/l (aggiunto tramite sterilizzazione a filtraggio) |

Le piastre Petri sono state mantenute in camera di crescita in condizioni controllate con fotoperiodo di 16/8 ore e temperatura 22/10°C. I controlli periodici sono stati effettuati con cadenza settimanale registrando il numero di semi contaminati e l'eventuale germinazione. I semi non contaminati sono stati trasferiti in nuove piastre identiche alle precedenti immediatamente dopo il conteggio (Figura 16).

Nonostante i vari test effettuati, non è stato finora possibile individuare una concentrazione e/o un tempo di esposizione ottimale per la sterilizzazione superficiale dei semi, a causa dell'elevata variabilità riscontrata nelle repliche. Tuttavia appare chiaro che la dose e il tempo di esposizione minori, ovvero 5% di ipoclorito di sodio per 5 minuti, non controllano adeguatamente lo sviluppo di microrganismi, poiché si riscontra sempre una percentuale significativamente più alta di contaminazione attorno ai semi già dopo una settimana dalla semina (ANOVA: F-ratio: 4,979;  $p < 0.05$ ; dati non mostrati).

La successiva semina alle condizioni sopra indicate non ha in ogni caso finora portato alla germinazione dei semi, nonostante questi appaiano in ottimo stato, anche a distanza di circa 5 mesi dalla semina.

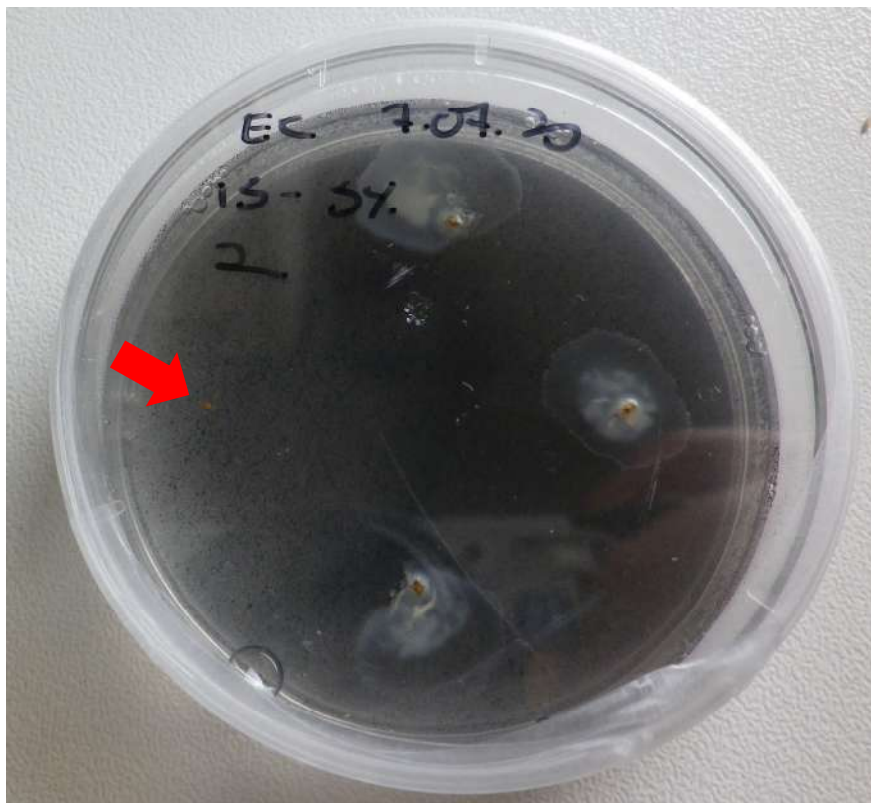


Figura 16: prove di sterilizzazione dei semi di *Eleocharis carniolica*: replica con 3 semi contaminati e 1 sano (indicato da una freccia; foto J. Bellingardi).

### ***Himantoglossum adriaticum***

I semi di *Himantoglossum adriaticum* raccolti nel 2019 sono stati seminati su substrato di Malmgren (1996) in un esperimento per confrontare l'efficacia di enzimi di origine fungina nella rottura del tegumento del seme e nella stimolazione della germinazione, secondo il metodo messo a punto da Pierce *et al.* (2018). Dopo la sterilizzazione del substrato nell'autoclave, gli enzimi furono aggiunti tramite un processo di filtrazione a freddo, per sterilizzare la soluzione evitando l'inattivazione degli enzimi da parte del calore. La concentrazione degli enzimi è stata sempre pari a due unità di enzima per piastra Petri, e i trattamenti utilizzati nell'esperimento sono stati laccasi, lipasi e xylanasi; sono state anche predisposte una prova con la miscela dei tre enzimi come controllo positivo, e una con substrato privo di enzimi come controllo negativo (Figura 17). L'esperimento è stato avviato il 5/2/2020; dopo nove mesi non è evidente la germinazione in nessun trattamento.

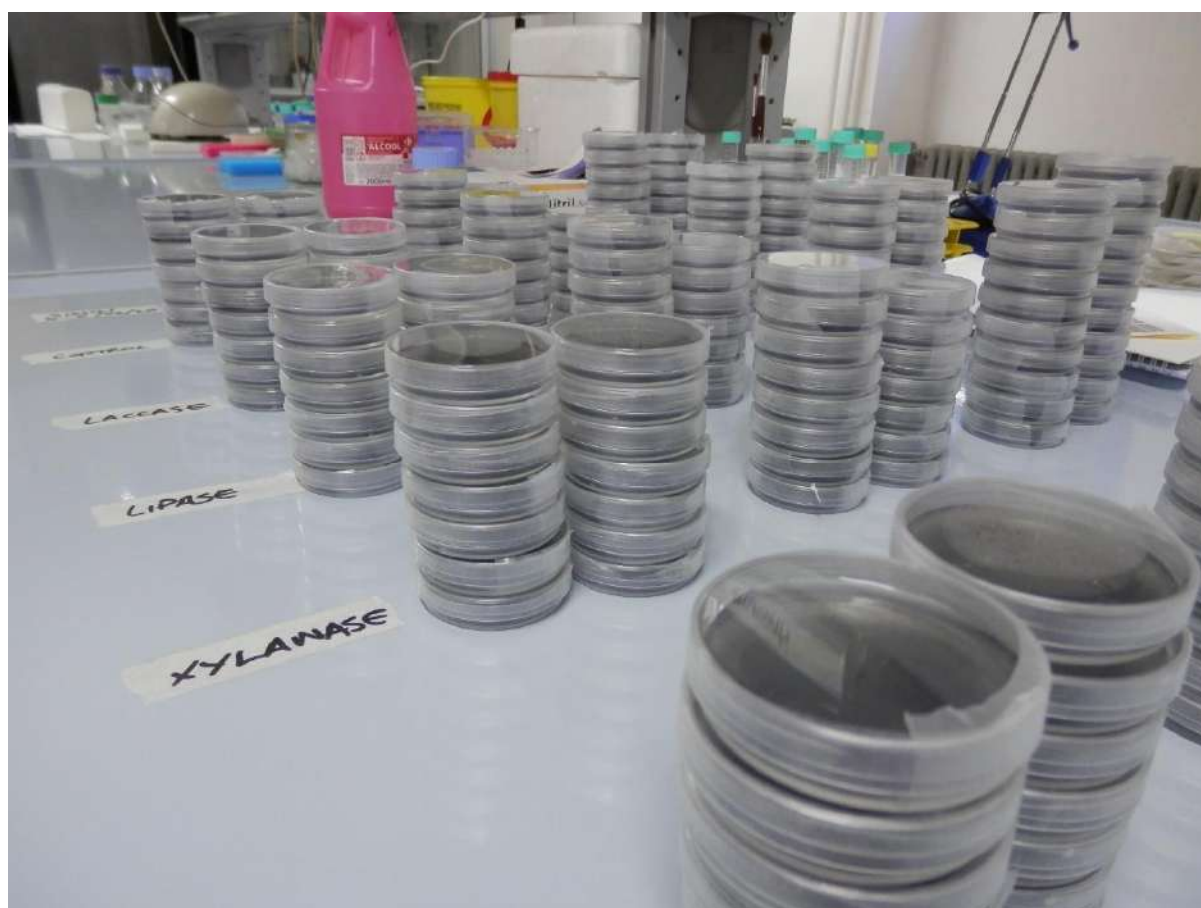


Figura 17: Semina di *Himantoglossum adriaticum* con diversi enzimi incorporati nel substrato: laccasi, lipasi, xylanasi, una miscela dei tre enzimi, e un controllo senza enzimi (foto S. Pierce).

**Liparis loeselii**

La semina nel 2019 aveva inizialmente l'obiettivo di utilizzare il substrato di Vejsadová (2006) sviluppato appositamente per *Liparis loeselii*. All'epoca tuttavia non era stato possibile produrre un substrato solido per ragioni ancora poco chiare. Si era quindi deciso di utilizzare il substrato proposto da Malmgren (1996) in un esperimento finalizzato alla verifica dell'efficacia di un ormone potenzialmente stimolante alla germinazione (0,1 mM 6-benzilaminopurina). Questa semina era stata realizzata utilizzando due tipi di contenitori, ovvero piastre Petri e tubi DeWitt®. La semina in questi ultimi non ha determinato alcun evento di germinazione, mentre tutte le piastre Petri prive di ormone (trattamento di controllo) sono state contaminate da un fungo proveniente dai semi. Con il progresso di questo esperimento nel 2020, è stata osservata ulteriore contaminazione, mentre nelle piastre integre, non è stata rilevata alcuna germinazione. Si ritiene che ciò derivi innanzitutto dall'adeguatezza del substrato Malmgren (1996) per questa specie, a cui si associa l'elevata contaminazione dei semi in natura, dovuta al lungo periodo di maturazione dei frutti, che in oltre tre mesi subiscono erbivoria, ingresso di acqua e contatto con funghi dall'ambiente circostante.

Stante la situazione, nel 2020 si è deciso di allestire un nuovo esperimento di germinazione in vitro in condizioni di sterilità, ritentando la preparazione del substrato messo a punto da Vejsadová (2006), i cui ingredienti sono elencati nella seguente tabella (modificata da Vejsadová, 2006):

| Germination medium (g l <sup>-1</sup> )         |       | Germination medium (g l <sup>-1</sup> )   |       |
|-------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0.216 | Ca pantothenate                           | 0.001 |
| MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O          | 0.246 | Na <sub>2</sub> EDTA . 2 H <sub>2</sub> O | –     |
| KCl                                             | 0.150 | Fe SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O   | –     |
| CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O          | 0.029 | Charcoal                                  | 1     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.132 | Agar ROTH                                 | 12    |
| Citric acid                                     | 0.192 | Agar Sigma                                | –     |
| Biotin                                          | 0.001 | Casein hydrolysate                        | 0.5   |
| Pyridoxine                                      | 0.001 | Yeast extract                             | 0.5   |
| Inositol                                        | 0.001 | Sucrose                                   | 20.0  |
| Folic acid                                      | 0.001 | Growth regulators                         | –     |
| Niacinamide                                     | 0.001 | pH                                        | 5.3   |

I semi raccolti nel 2020 (Figura 18 A) sono stati quindi seminati in 50 piastre Petri (Figura 18 B). La produzione del substrato è riuscita, forse grazie ad una maggiore precisione riguardo al controllo del pH e all'ottimale funzionalità dell'autoclave.

Anche i semi raccolti nel 2020 hanno mostrato un alto tasso di contaminazione fungina e, alla luce della procedura di sterilizzazione della superficie del seme in laboratorio, è evidente che i semi vengono regolarmente contaminati in campo. Purtroppo, solo il 16% delle piastre Petri dalla semina 2020 non risulta al momento contaminato (Figura 18 C): su queste piastre prosegue l'osservazione dei semi in attesa di eventi di germinazione.

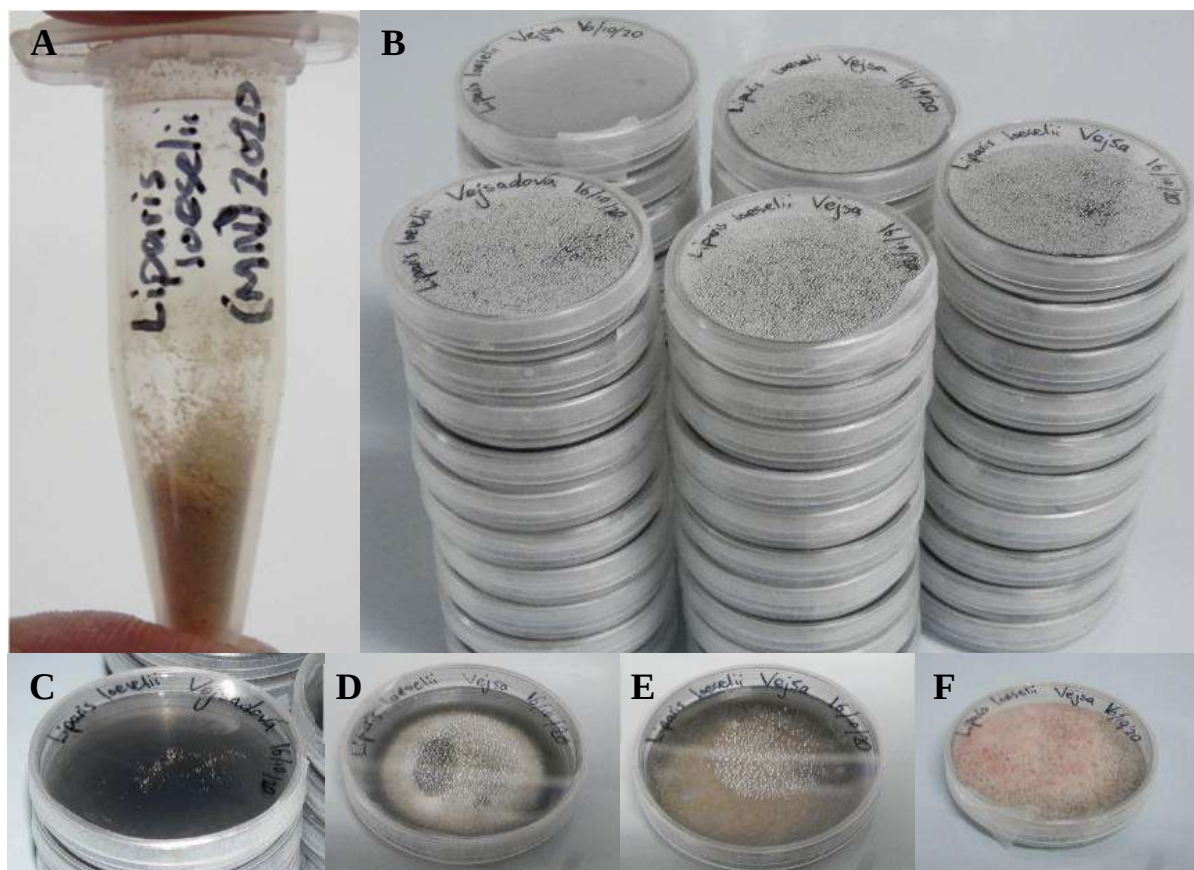


Figura 18. Semina di *Liparis loeselii*: A: semi raccolti nel 2020; B: 50 piastre Petri allestite per la prova di germinazione (17/10/2020); C: semi non contaminati e non germinati a 42 giorni dalla semina (27/11/2020); D, E e F: contaminazione delle piastre da parte di vari funghi presenti all'interno dei semi (foto S. Pierce).

### ***Saxifraga presolanensis***

Come indicato nel paragrafo relativo all'Attività B - Raccolta del materiale di propagazione in natura, nel 2020 non è stato possibile campionare materiali di propagazione per *Saxifraga presolanensis*. Si sta valutando se avviare prove di germinazione utilizzando i semi conservati presso la LSB e raccolti in natura negli anni 2008 e 2009; in questo caso gli esiti della sperimentazione potranno infatti dipendere dall'età dei semi e/o dalle modalità di conservazione ex situ, e pertanto non essere applicabili a semi freschi.

## Protocolli sviluppati da altri soggetti, ma coordinati dal LIFE

### *Cypripedium calceolus*

La sperimentazione sulla propagazione *ex situ* di *Cypripedium calceolus* è stata avviata dal Dip.to di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Milano, nell'ambito del progetto *Cold&Warm - Cold-adapted species: lessons from the past to face future warming* (finanziamento LifeWatch Italy), e attualmente prosegue con fondi propri.

La semina *in vitro* dei semi immaturi di *C. calceolus* è stata effettuata utilizzando il metodo di Ramsey (1998), basata sull'impiego del substrato di Malmgren (1996) ma con particolare attenzione alle condizioni ambientali: va infatti mantenuta temperatura inferiore ai 25°C dopo la semina e successivamente esporre i semi ad un trattamento di gelo. Questo metodo ripropone i cambiamenti di temperatura ambientale graduale durante le stagioni, ed è stato replicato in laboratorio collocando le piastre Petri in camere di crescita e poi in un armadio di acciaio collocato all'esterno.

Nel 2019 è stata effettuata una semina sperimentale *in vitro* in condizioni sterili con semi immaturi, subito dopo la raccolta dei semi in natura (30/7/2019; vedi Relazione annuale, 2019). Questi semi sono germinati all'incirca tre mesi e mezzo dopo la semina, con protocormi evidenti a 106 giorni dalla semina (Figura 19). Nonostante l'attenzione ad indurre artificialmente le variazioni termiche durante il 2020 secondo il metodo di Ramsey (1998), i protocormi non hanno mostrato segni di ulteriore sviluppo di radici o gemme, né le mostrano all'ultimo controllo effettuato in novembre. A completamento della sperimentazione anche i semi raccolti nel 2020 sono stati seminati con lo stesso metodo. Questo consentirà nel 2021 di ottenere un numero il più possibile elevato di protocormi su cui effettuare prove per stimolarne l'ulteriore sviluppo, ad esempio tramite trasferimenti su substrati diversi e/o applicando condizioni di crescita contrastanti.

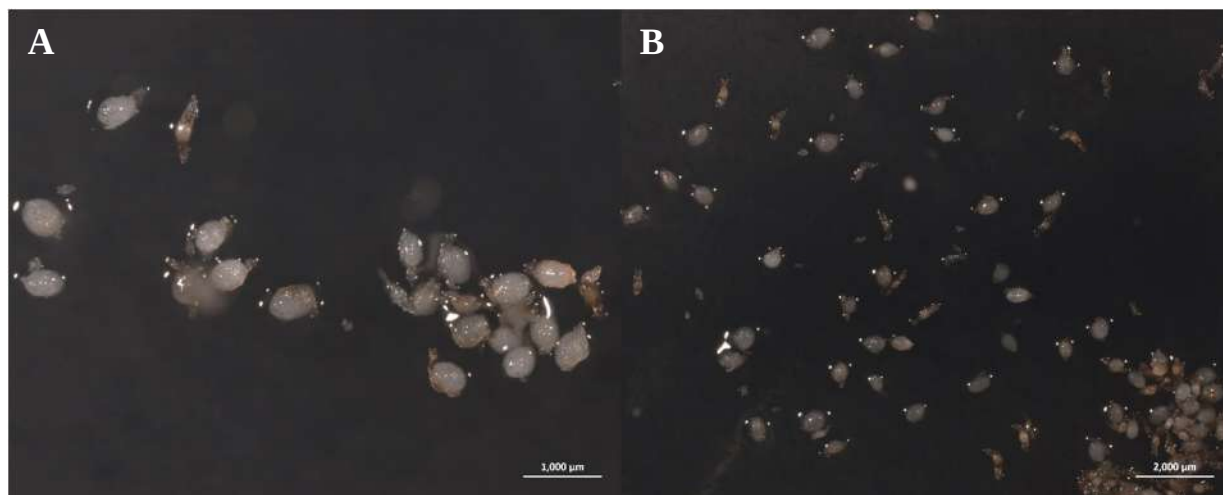


Figura 19: Protocormi di *Cypripedium calceolus* a 106 giorni dalla semina di semi immaturi raccolti nel 2019 (foto S. Pierce).

### ***Gladiolus palustris***

Riguardo alla specie *Gladiolus palustris*, prosegue presso le strutture del CFA, l'osservazione e la raccolta dati di un programma di propagazione sperimentale avviato nel novembre 2015 dal Parco Monte Barro nell'ambito del progetto "Biodiversità 2015" e ora seguito autonomamente dal personale CFA.

L'osservazione delle piante in coltivazione conferma la lentezza nello sviluppo degli individui, ormai al terzo anno di vita. Non sono stati riscontrati eventi di mortalità significativi, né fenomeni di deperimento e/o malattia delle piante, che tuttavia appaiono ancora molto piccoli e non hanno ovviamente raggiunto la maturità riproduttiva (Figura 20).

Nell'autunno 2020 sono stati seminati direttamente in terriccio in condizioni ambientali, i lotti campionati nell'estate dello stesso anno, con l'obiettivo principale di verificare la vitalità del lotto campionato in località Sasso Malascarpa (LC; v. sopra per dettagli).



Figura 20: Come negli anni precedenti, parte dei bulbi di *Gladiolus palustris* avviano la ripresa vegetativa già nel mese di novembre (foto R.M. Ceriani).

### ***Primula spectabilis***

Per quanto riguarda *Primula spectabilis* nel 2020 è proseguita presso il CFA la sperimentazione avviata nel 2019. Non essendo disponibili informazioni sulla propagazione *ex situ* di questa specie, si è optato per l'impiego sperimentale del metodo già noto per la germinazione dei semi della specie sorella *Primula glaucescens* (Cerabolini *et al.*, 2004), applicando il protocollo ai lotti di semi raccolti nella stagione 2019 nelle località Dosso Alto (BS), Tremalzo (BS) e Turano (BS). L'esito della prima prova si è rivelato deludente, con un tasso di contaminazione dei semi e/o dei substrati elevatissimo e pari in media al 76,25% con picchi del 100% già a una settimana dalla semina. La contaminazione non ha compromesso completamente la germinazione, ma ha comportato il tempestivo trasferimento delle giovanissime plantule in nuovo substrato per garantirne la sopravvivenza. Visti i risultati ottenuti, si è reso necessario l'allestimento di una prova per la valutazione delle modalità di sterilizzazione superficiale dei semi, impostando per un solo lotto (*Primula spectabilis* di Dosso Alto), il confronto tra i seguenti tempi di esposizione ad ipoclorito di sodio 5%:

#### **Tempo di esposizione**

10 minuti  
20 minuti  
30 minuti  
60 minuti

Una volta sterilizzati in superficie, i semi sono stati seminati *in vitro* in condizioni di sterilità in piastre Petri su di un substrato di coltura preparato come da seguente tabella:

| <b>Ingrediente</b>              | <b>Quantità</b>                                          |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Agar                            | 7 g/l                                                    |
| Saccarosio                      | 20 g/l                                                   |
| Sali Murashige and Skoog (1962) | 2,150 g/l (=mezza forza)                                 |
| Carbone attivo                  | 0,5 g/l                                                  |
| GA3                             | 100 mg/l (aggiunto tramite sterilizzazione a filtraggio) |

Le piastre Petri sono state mantenute in camera di crescita in condizioni controllate con fotoperiodo di 16/8 ore e temperatura 22/10°C. I controlli periodici sono stati effettuati con cadenza settimanale registrando il numero di semi contaminati e l'eventuale germinazione. I semi non contaminati sono stati trasferiti in nuove piastre identiche alle precedenti immediatamente dopo il conteggio.

La contaminazione a una settimana dalla semina è risultata mediamente pari al 26,55% e la sterilizzazione superficiale con ipoclorito di sodio al 5% per 60 minuti ha portato a valori bassi di contaminazione percentuale (valore medio: 8,39%) anche in assenza di differenze statisticamente significative tra i pre-trattamenti (ANOVA F-ratio: 1,292 p=0,296 ns.; Figura 21). Per quanto riguarda la germinazione al termine del test (a 30 giorni dalla semina), si è riscontrato un tasso di germinazione pari al 94,03% senza differenze statisticamente significative in relazione al trattamento di sterilizzazione (ANOVA F-ratio: 0,106, p=0,955 ns.; Figura 22). Allo stato attuale, si ritiene pertanto che il metodo più efficiente per consentire la germinazione dei semi di *Primula spectabilis* sia quello che prevede una sterilizzazione superficiale dei semi con ipoclorito di sodio al 5% per 60 minuti, in quanto con tempi di esposizione minore si rendono necessarie ulteriori procedure di trasferimento dei semi non contaminati e rifacimento delle piastre Petri, con rischio di perdita degli stessi e/o delle eventuali plantule già presenti.

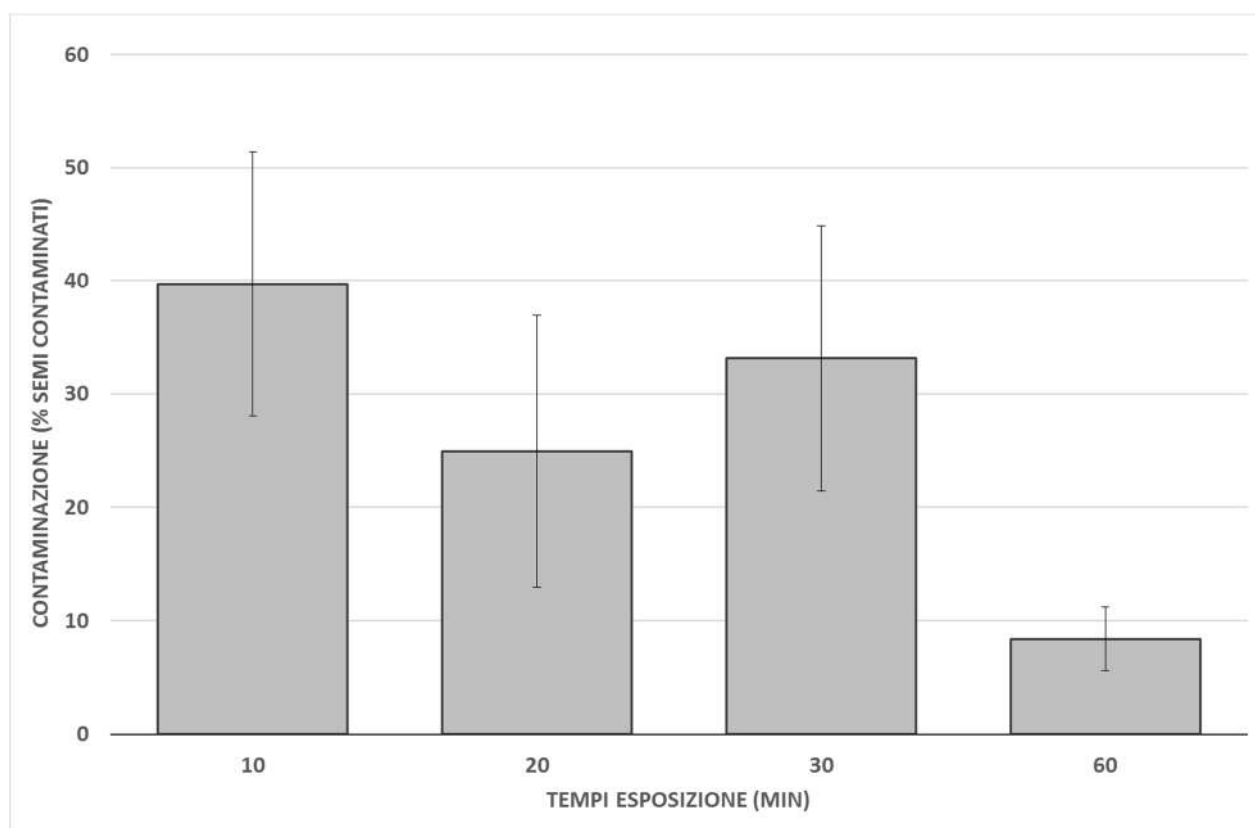


Figura 21: Contaminazione dei semi di *Primula spectabilis* ad una settimana dalla semina previo trattamento di sterilizzazione superficiale con ipoclorito di sodio 5% per diversi tempi di esposizione.

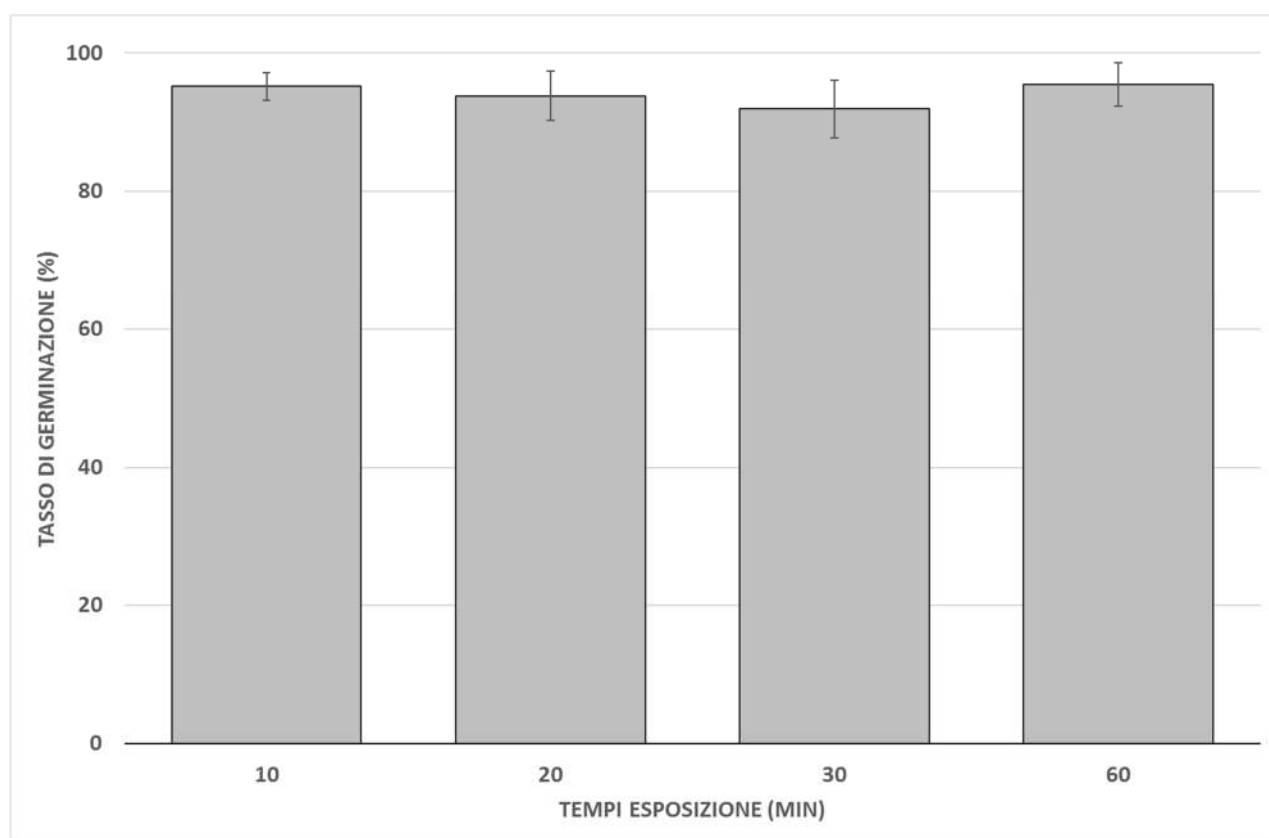


Figura 22: Germinazione finale dei semi di *Primula spectabilis* previo trattamento di sterilizzazione superficiale con ipoclorito di sodio 5% per diversi tempi di esposizione.

Le piante ottenute nel corso del test di germinazione sono state fatte sviluppare nelle medesime piastre per circa 6-8 settimane dalla semina, prima di provvedere al loro trasferimento in contenitori più grandi, sempre *in vitro* in condizioni di sterilità. I fattori che determinano la scelta del momento di trasferimento sono i seguenti:

- grado di sviluppo degli apparati radicali con radici che iniziano ad attorcigliarsi tra loro, con conseguente maggiore difficoltà nelle successive fasi di estrazione delle singole plantule/piante;
- evidenti segnali di sofferenza delle plantule per carenze del substrato di crescita (esaurimento dei nutrienti);
- competizione con plantule/piante adiacenti, anche in relazione alle dimensioni delle piastre e al numero di semi presenti/germinati.

Le piante di *Primula spectabilis* sono state pertanto trasferite singolarmente in tubi De Witt® contenenti il medesimo substrato sopra descritto, eccezion fatta per l'aggiunta di ormone GA3 (Figura 23). Anche per quanto riguarda le condizioni di crescita, si è mantenuto quanto impostato per le fasi di germinazione e primo sviluppo.

Il successivo trasferimento in terriccio ha avuto luogo quando le piante hanno raggiunto le dimensioni ottimali, con radici e foglie ben sviluppate ad occupare lo spazio disponibile nel contenitore. In alcuni casi il substrato incominciava inoltre a fessurarsi proprio a causa della crescita dell'apparato radicale e/o alcune foglie davano segni di deperimento colorandosi parzialmente di giallo. In linea di massima il trasferimento in terriccio è avvenuto a circa 4-5 mesi dalla semina in più fasi a seconda delle caratteristiche delle piante. Il substrato utilizzato era costituito da terriccio standard e perlite in rapporto 5:1 e per il momento non sono state avviate prove di confronto (Figura 23).

Il trasferimento in terriccio ha previsto la completa e delicata rimozione del substrato a base di agar dalle radici; inoltre, per ridurre i potenziali danni alle piante e facilitarne l'acclimatazione, si è provveduto al mantenimento delle stesse in condizioni di elevata umidità relativa per alcuni giorni. Questo può essere ottenuto coprendo le piantine con coperchio De Witt®, oppure conservando i vasetti in serre di acclimatazione con frequente nebulizzazione, come quelle normalmente utilizzate per la propagazione per talea. Dopo 5-7 giorni i coperchi possono essere gradualmente rimossi, e/o le piante spostate all'aperto o in serre non nebulizzate a seconda della stagione.

Le fasi di trasferimento delle piante dalle piastre di germinazioni ai tubi De Witt®, al terriccio, comportano dispendio di tempo e di risorse economiche sia in termini di materiali e consumi energetici, sia in termini di personale e attrezzature specializzate. Per questa ragione, e grazie anche al gran numero di plantule prodotte, erano state programmate alcune prove speditive per accelerare i tempi di produzione delle piante e/o evitare le fasi più onerose: l'esito di queste prove è stato tuttavia compromesso dal *lockdown* associato all'emergenza dovuta alla pandemia da Covid 19, che ha comportato una riduzione nella frequenza dei controlli in laboratorio/serra e/o il trasferimento delle piante a casa degli operatori coinvolti in assenza di strutture e strumentazioni adeguate. Le prove effettuate erano comunque volte a verificare l'efficacia delle procedure descritte di seguito per le quali si riportano anche alcuni commenti operativi.

Trasferimento diretto da piastre Petri a terriccio: riscontrata un'elevata mortalità delle piante probabilmente influenzata dall'impossibilità di controllo delle condizioni ambientali (Figura 24).



Figura 23: Coltivazione di *Primula spectabilis*: in alto piante in fase di sviluppo in vitro in condizioni di sterilità all'interno di tubi De Witt®; a sinistra: piante appena trasferite da vitro a terriccio; in secondo piano piante coperte con coperchio De Witt® per il mantenimento di elevata umidità relativa in prossimità delle foglie per facilitare l'acclimatazione da condizioni controllate a condizioni ambientali (foto J. Bellingardi).

Trasferimento da piastre Petri a contenitori in vetro di più grandi dimensioni, più economici e riciclabili rispetto ai tubi De Witt®: riscontrate problematiche inerenti la solidificazione del substrato, la facilità di trasferimento delle singole piante, la diffusione rapida di contaminanti batterici e/o fungini, con potenziale perdita di grandi numeri di piante (Figura 25).

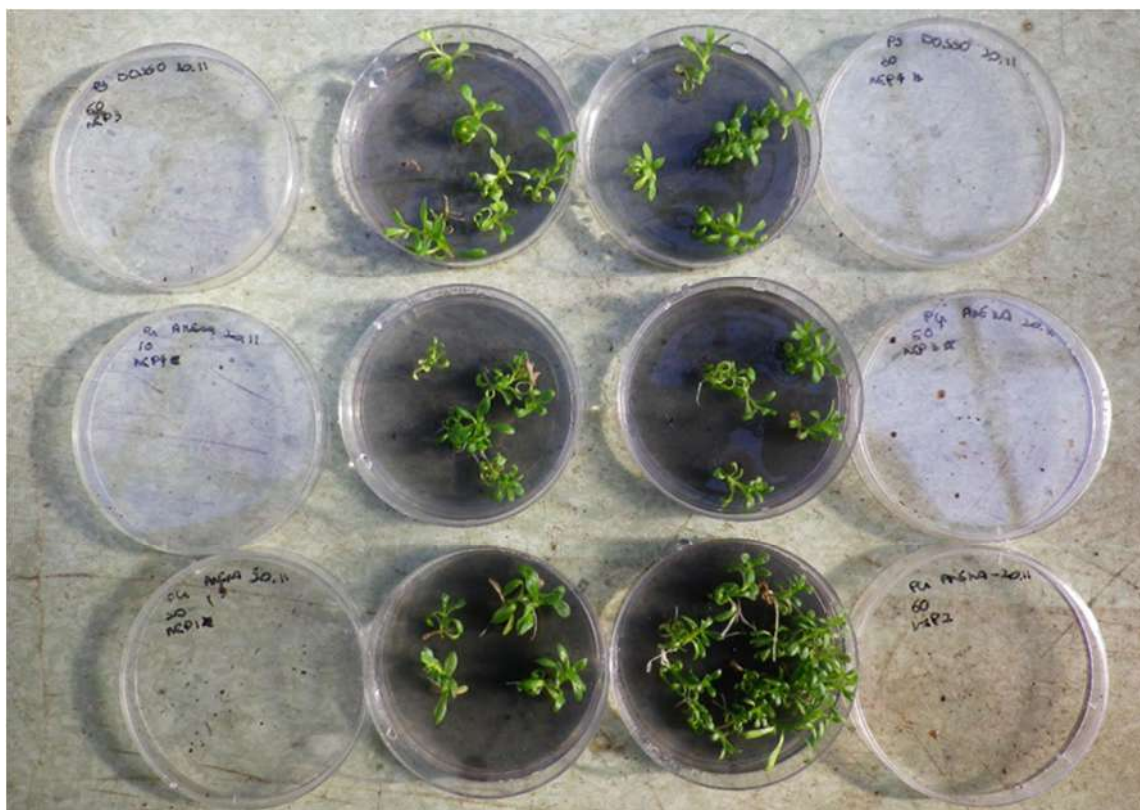


Figura 24: Piastre Petri con piante di *Primula spectabilis* (prima fila in alto) e *Primula glaucescens* pronte per il trasferimento diretto in terriccio (foto J. Bellingardi).



Figura 25: Problemi associati al trasferimento di *Primula spectabilis* da piastre Petri a contenitori in vetro. A sinistra: mancata solidificazione del substrato; a destra: contaminazione del substrato con mortalità delle piante (foto J. Bellingardi).

Semina diretta in terriccio evitando completamente la germinazione *in vitro* in condizioni di sterilità e le successive fasi di acclimatazione: si è osservata la germinazione di 6 semi dei 50 seminati, con un tasso di germinazione pari al 12%. La germinazione è avvenuta quattro mesi dopo la semina effettuata il 6 dicembre 2019 (Figura 26).

### ***Spiranthes aestivalis***

Le indagini sulla propagazione *ex situ* di *Spiranthes aestivalis* sono state avviate dal Dip.to di Scienze Agrarie e Ambientali dell'Università degli Studi di Milano, nell'ambito del progetto *Cold&Warm - Cold-adapted species: lessons from the past to face future warming* (finanziamento LifeWatch Italy), e proseguono ora con fondi propri del Dipartimento.

Al momento di stesura della presente relazione, i semi di *Spiranthes aestivalis* non sono stati ancora seminati e vengono conservati a 4 °C; ciò è dovuto alla contingentazione e alla turnazione dell'accesso al laboratorio a causa dell'emergenza da Covid 19.



Figura 26: Plantula di *Primula spectabilis* germinata in seguito a semina diretta in terriccio (foto J. Bellingardi, 15/06/2020).

## Protocolli esistenti oggetto di verifica

Come indicato nella relazione 2019, per le specie *Linaria tonzigii*, *Physoplexis comosa* e *Primula glaucescens* sono già noti protocolli di coltivazione sviluppati in passato dal CFA (Cerabolini *et al.*, 2004; Pierce *et al.*, 2019). Tali protocolli vengono ora impiegati per le seguenti finalità:

- verificare la vitalità dei semi raccolti nel corso della stagione 2019;
- verificare la vitalità dei semi più vecchi presenti nella banca del germoplasma;
- produrre piante.

Di seguito si descrive lo stato di fatto per ciascuna specie

### *Linaria tonzigii*

La vitalità dei semi di *Linaria tonzigii* campionati nel 2019 è stata valutata tramite test di germinazione. Il tasso di germinazione medio è risultato pari al  $49,71\% \pm 3,29$ , con minimo del  $27,27\%$  e massimo del  $71,43\%$ . Questi valori sono riferiti ai semi più scuri che nei lotti di semi di *Linaria tonzigii* costituiscono la maggior parte. Sono infatti presenti, anche se in misura minore, pure semi di colore più chiaro: questi semi mostrano tassi di germinazione significativamente minori (valore medio  $25,34\% \pm 3,40$ ; ANOVA: F-ratio: 11.731,  $p < 0,01$ ; dati non mostrati). I risultati appaiono in linea con quanto ottenuto da Pierce *et al.* (2019): pur avendo osservato un tasso di germinazione massimo pari al  $65,1\%$ , gli Autori evidenziano infatti un'elevata variabilità di risposta della specie, in relazione all'origine dei semi (ad es. anno di raccolta, popolazione, ecc.).

Anche i semi conservati in banca del germoplasma e raccolti nella medesima località nel 2004, hanno risposto positivamente alla prova di germinazione con tasso medio pari al  $58,54\% \pm 7,27$  (test eseguito solo su semi scuri). Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra questo risultato e quello ottenuto con i semi campionati nel 2019 (*t*-test di Student:  $p = 0,354$ ; dati non mostrati).

I vari test effettuati hanno portato allo sviluppo di 300 piantine adatte, già dopo circa 45 giorni dalla semina, al trasferimento in tubi De Witt® per l'ulteriore accrescimento *in vitro* in condizioni di sterilità. Di queste piante iniziali, 143 sono risultate idonee al successivo trasferimento in terriccio dopo ulteriori 6 mesi nell'ottobre 2020. L'osservazione dei restanti individui ha evidenziato problemi nello sviluppo dell'apparato radicale, e, sebbene vengano tuttora conservati *in vitro*, non si nutrono molte speranze riguardo alla loro sopravvivenza. Il trasferimento in terriccio ha tenuto conto sia della precedente esperienza del CFA (Ferrario & Ceriani, 2010; Pierce *et al.*, 2019), sia dell'osservazione del substrato di crescita in natura, appositamente campionato nell'estate 2020: si è pertanto preparata una miscela di terriccio commerciale e ghiaietto di Moregallo, in rapporto 40:60. La scelta del ghiaietto di Moregallo è stata effettuata in quanto più ricco di parti fini in analogia al campione raccolto in natura. Le piante sono state mantenute per una settimana in serra di acclimatazione con frequente nebulizzazione, normalmente utilizzata per la propagazione per talea; da qui sono state successivamente trasferite in serra fredda e, a breve, saranno conservate all'aperto per tutto l'inverno. L'attività di trasferimento in terriccio e successiva acclimatazione in serre e all'aperto viene seguita dall'Azienda Agricola Vivai Panzeri in Galbiate (LC) che dispone delle attrezzature e delle conoscenze necessarie. In Figura 27 si riportano alcune immagini relative alla coltivazione di *Linaria tonzigii*.



Figura 27: Sintesi della propagazione di *Linaria tonzigii*: germinazione *in vitro* (in alto), trasferimento da piastre Petri a tubi De Witt® (in centro), e da questi al terriccio (in basso; foto J. Bellingardi e A. Panzeri).

### ***Physoplexis comosa***

La vitalità dei semi di *Physoplexis comosa* campionati nel 2019 è stata valutata tramite test di germinazione. Il tasso di germinazione medio è risultato pari al  $33,29\% \pm 6,57$ , con minimo del  $7,14\%$  e massimo del  $50,00\%$ . I risultati ottenuti risultano inferiori a quanto riscontrato da Cerabolini *et al.* (2004) seguendo esattamente la stessa procedura di germinazione: ciò può essere dovuto a differenze associate alla popolazione di provenienza dei semi, incluse oggettive problematiche di vitalità, oppure all'andamento climatico della stagione di raccolta. A questo proposito si evidenzia che nel 2019, nella stazione di Bellagio, la maturazione dei semi è indicata dall'apertura spontanea delle capsule, si è protratta per lungo tempo e la raccolta degli stessi è stata accelerata nel mese di settembre a causa dell'abbondante presenza di lumache sulle piante e in particolare sulle infruttescenze. Questo può aver determinato la presenza di semi non completamente maturi nel lotto 2019.

Il confronto con i semi conservati in banca del germoplasma è stato possibile solo con semi campionati in altra località, anche se si è avuta l'accortezza di scegliere il lotto proveniente dalla popolazione più prossima a quella oggetto di raccolta nel 2019. Il confronto è stato pertanto eseguito con semi campionati nel 2004. Le prove hanno dato esito positivo con tasso di germinazione medio pari a  $20,90\% \pm 3,06$ . Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra questo risultato e quello ottenuto con i semi campionati nel 2019 (*t*-test di Student:  $p=0,171$ ; dati non mostrati).

Il protocollo esistente (Cerabolini *et al.*, 2004) è riferito esclusivamente alla procedura di germinazione *ex situ*. Non è nota infatti alcuna produzione di piante mature di *Physoplexis comosa*, né di una metodologia di coltivazione in vitro e/o in terriccio relativa al successivo sviluppo delle piante. Le piante ottenute dalla germinazione dei semi, sono state pertanto oggetto di particolare attenzione, seguendo nel dettaglio le varie fasi di trasferimento secondo le procedure in uso.

Un passaggio particolarmente delicato è rappresentato dal trasferimento da piastre Petri a tubi De Witt® sempre in vitro in condizioni di sterilità. Questa operazione è stata effettuata quando le piante germinate hanno sviluppato lunghe radici e prima che iniziassero a presentare i primi segni di sofferenza (ingiallimento); il trasferimento è avvenuto a due mesi e mezzo dalla semina. L'operazione è risultata piuttosto difficoltosa perché fusti e radici risultano molto fragili con elevato rischio di rottura.

Anche la successiva fase di trasferimento da vitro a terriccio, ha presentato aspetti problematici soprattutto riguardo all'individuazione del periodo ottimale. Le piante sono state infatti trasferite quando il substrato di crescita è apparso esaurito con conseguente crescita stentata. Questa situazione è comparsa nel periodo di lockdown dovuto alla pandemia da Covid 19, e, non potendo allestire una prova comparativa, si è optato per il trapianto in terriccio con osservazione presso le abitazioni del personale coinvolto. Le piante ottenute hanno mostrato un buon grado di sopravvivenza nei primi mesi, ma un successivo declino nella seconda metà dell'estate e in autunno: l'ultima pianta sopravvissuta è morta nella seconda metà del mese di novembre. Ulteriori prove saranno finalizzate ad ottimizzare il passaggio descritto, prevedendo un'ulteriore fase di accrescimento in vitro in condizioni di sterilità, con substrato arricchito con ormoni stimolanti lo sviluppo dell'apparato radicale, in modo da ottenere piante più robuste al momento del trasferimento in terriccio.

In Figura 28 si riportano alcune immagini relative alla coltivazione di *Physoplexis comosa*.

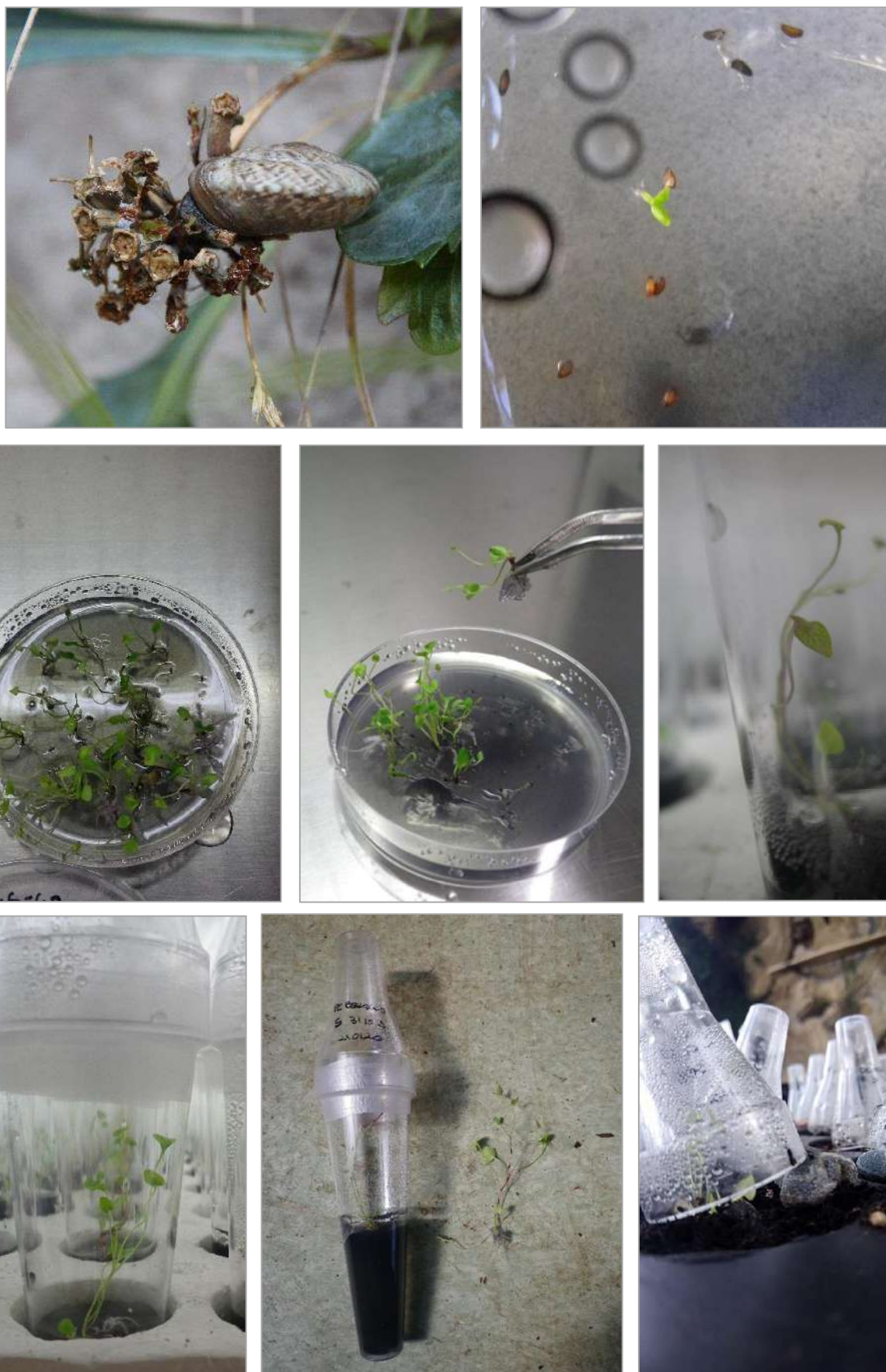


Figura 28: Sintesi della propagazione di *Physoplexis comosa*: predazione sui semi e germinazione *in vitro* (in alto), trasferimento da piastre Petri a tubi De Witt® (in centro), e da questi al terriccio (in basso; foto J. Bellingardi).

### ***Primula glaucescens***

La vitalità dei semi di *Primula glaucescens* raccolti nella stagione vegetativa 2019 è stata esaminata mediante test di germinazione, ottenendo un tasso di germinazione pari a  $86,21\% \pm 2,81$ , con minimo del 50% e massimo del 100%. Il risultato ottenuto conferma anche l'efficacia dei protocolli esistenti nella germinazione dei semi, ed è in linea con quanto ottenuto da Cerabolini *et al.* (2004).

Anche la verifica della vitalità dei semi conservati in Banca del Germoplasma ha dato esito positivo. In questo caso sono stati messi a confronto semi raccolti nella medesima località (Pizzo Arera) in anni diversi (2004, 2008 e 2019) e l'analisi dei risultati non ha evidenziato differenze statisticamente significative (ANOVA: F-ratio: 0,696,  $p=0,523$ , ns; dati non mostrati).

La relativamente elevata disponibilità di plantule prodotte *in vitro* ha premesso di allestire una sperimentazione finalizzata all'ottimizzazione del protocollo di propagazione, soprattutto in riferimento al contenimento degli oneri associati alla produzione specialistica *in vitro*. Come per *Primula spectabilis* (v. sopra), sono state pertanto realizzate alcune prove speditive, il cui esito è stato tuttavia compromesso almeno in parte dal *lockdown* associato all'emergenza per la pandemia da Covid 19. Per quanto riguarda le prove di trasferimento delle piante da piastre Petri direttamente a terriccio e di trasferimento da piastre Petri a contenitori in vetro, i risultati sono stati del tutto analoghi a quanto già descritto per *P. spectabilis* e si conferma pertanto la necessità di un passaggio *in vitro* in tubi De Witt®, prima del trapianto in terriccio e fino al completo sviluppo delle piante. Allo stesso modo la prova di semina diretta in terriccio ha dato esito negativo con la germinazione di un solo seme (tasso di germinazione: 2%). In Figura 29 si riportano alcune immagini relative alla coltivazione di *Primula glaucescens*.

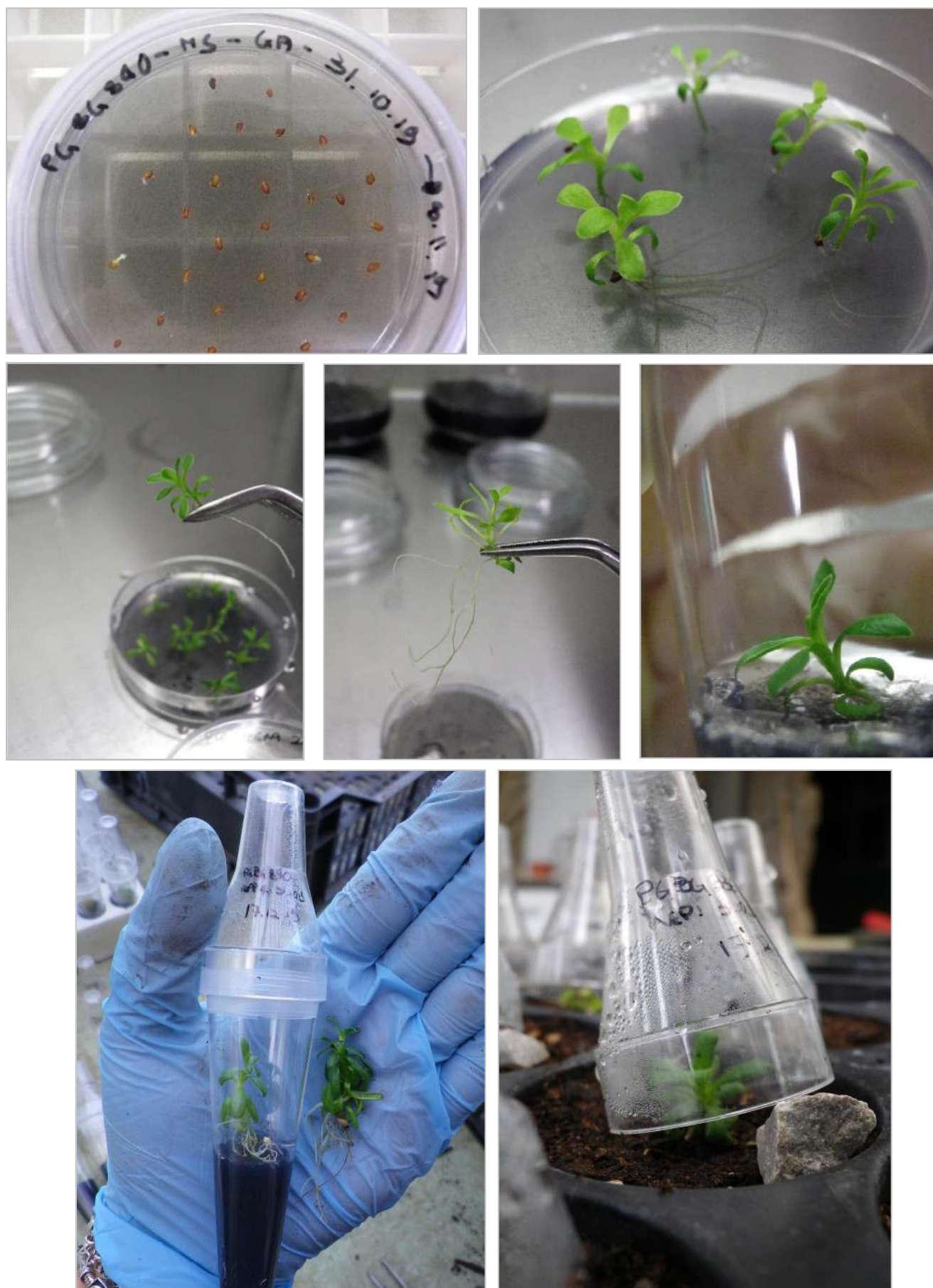


Figura 29: Sintesi della propagazione di *Primula glaucescens*: germinazione *in vitro* (in alto), trasferimento da piastre Petri a tubi De Witt® (in centro), e da questi al terriccio (in basso; foto J. Bellingardi).

## Attività E - Propagazione vera e propria con produzione di piante radicate

L'attività E prevede la produzione di piante delle specie per cui è prevista la stesura di nuovi protocolli di coltivazione come da Tabella 1 del Capitolato Tecnico e precisamente: *Mannia triandra*, *Hamatocaulis vernicosus*, *Riccia breidleri*, *Isoetes malinverniana*, *Marsilea quadrifolia*, *Saxifraga presolanensis*, *Dracocephalum austriacum*, *Eleocharis carniolica*, *Liparis loeselii* e *Himantoglossum adriaticum*. A queste specie si aggiungono *Primula spectabilis*, *Spiranthes aestivalis*, *Cypripedium calceolus* e *Gladiolus palustris* la cui propagazione deve essere sviluppata da soggetti diversi da ERSAF, ma con coordinamento LIFE, in analogia alla stesura dei relativi protocolli di coltivazione.

Per quanto riguarda *Mannia triandra* la definizione del protocollo di coltivazione è stata associata, su iniziativa e finanziamento da parte del Parco Monte Barro, ad un intervento sperimentale di rafforzamento *in situ*, effettuato nell'ottobre 2020 sul Monte Barro in corrispondenza delle popolazioni ivi recentemente rinvenute. L'esito del monitoraggio degli interventi potrà eventualmente costituire un'utile integrazione del protocollo di cui all'Allegato A. Per quanto riguarda la produzione di nuove piante, questa sarà avviata non appena sarà nota la data e l'ubicazione degli interventi di reintroduzione s.l., tenendo presente che il periodo ottimale per la messa a dimora è l'autunno e che la propagazione da spore richiede almeno 12 mesi, periodo pari pertanto all'anticipo necessario per la richiesta delle piante.

Relativamente alle specie *Isoetes malinverniana* e *Marsilea quadrifolia*, secondo quanto concordato in fase di incarico e date le oggettive difficoltà di conservazione *ex situ*, restano a disposizione non meno di 5 piante per specie in luogo idoneo presso l'Università degli Studi di Pavia. Tale conservazione delle piante sarà garantita per 3 anni e precisamente fino al 30.11.2023. Il ritiro del materiale vegetale dovrà essere concordato da ERSAF con il personale del CFA mediante comunicazione scritta con almeno 60 giorni di anticipo, al fine di consentire l'idonea preparazione per il trasporto.

Per quanto riguarda le altre specie, la propagazione sarà avviata una volta definito il protocollo di coltivazione. Si è in ogni caso provveduto alla conservazione e alla coltivazione in terriccio di tutte le piante residuo della sperimentazione, sebbene per buona parte di esse si siano osservati alti tassi di mortalità. Per questa ragione si stanno pianificando modifiche specie-specifiche nella composizione del substrato e/o nelle condizioni di acclimatazione. In Tabella 4 si riporta l'elenco delle specie trasferite in terriccio per scopi puramente produttivi.

Tabella 4: Specie trasferite in terriccio per scopi puramente produttivi nel 2020.

| specie                     | anno di raccolta | località di raccolta | da piastre Petri a tubi DeWitt® | da tubi DeWitt® a terriccio |
|----------------------------|------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>Linaria tonzigii</i>    | 2004 e 2019      | Pizzo Arera (BG)     | 300                             | 143                         |
| <i>Physoplexis comosa</i>  | 2019             | Bellagio (CO)        | 143                             | 137                         |
| <i>Primula glaucescens</i> | 2004, 2008, 2019 | Pizzo Arera (BG)     | 119                             | 105                         |
| <i>Primula spectabilis</i> | 2019             | Dosso Alto (BS)      | 115                             | 110                         |

## Attività F - Verifica della capacità germinativa di *Saxifraga tombeanensis*

L'Attività F prevede la verifica della reale capacità germinativa *in situ* di *Saxifraga tombeanensis*, nonché lo studio della capacità di germinazione in laboratorio con la messa a punto di protocolli di coltivazione. L'Attività F viene svolta in stretta relazione con Dott. Stefano Armiraglio, curatore botanico del Museo Civico di Scienze Naturali di Brescia, nonché stretto collaboratore della Comunità Montana Parco Alto Garda Bresciano, nel cui territorio ricade la maggior parte delle stazioni lombarde note di *Saxifraga tombeanensis*.

Nella stagione vegetativa 2020, a causa dell'emergenza sanitaria tuttora in atto è stato possibile visitare le stazioni oggetto di monitoraggio solo in data 23 giugno 2020.

Nella stazione di Cadria (BS), la fioritura ha interessato un numero ridotto di pulvini (8); il ciclo riproduttivo era ormai terminato al momento del monitoraggio, le capsule erano del tutto aperte, con carpelli quasi del tutto disseccati. È stato comunque possibile campionare semi utili alla sperimentazione per la messa a punto del protocollo di propagazione *ex situ*. Alla base della parete rocciosa, in corrispondenza delle nicchie più umide è stata verificata la presenza delle giovani plantule già rilevate nel 2019 (Figura 30). Queste presentano rosette più strutturate e costituite da un numero superiore di foglie rispetto allo scorso anno. Dal confronto delle immagini risulta presente una giovane plantula non rilevata precedentemente, anche se non è escluso che quest'ultima fosse già presente nel 2019.



Figura 30: Plantule e/o giovani individui di *Saxifraga tombeanensis* oggetto di monitoraggio nella stazione di Cadria (BS; 17/07/2019 e 23/06/2020; foto S. Armiraglio).

La stazione di Corna Rossa (BS), sebbene raggiungibile a piedi, non è di facile accesso, per cui il repertorio fotografico relativo al 2020 non è disponibile. Anche in questa stazione il ciclo riproduttivo era in fase avanzata. Sporadici fiori in i cui petali erano in fase di avvizzimento sono stati rilevati su alcuni pulvini nel corso del monitoraggio. Le capsule presenti erano quasi del tutto aperte, ma i carpelli risultavano vascolarizzati e ancora del tutto verdi. Il campionamento dei semi ha dato comunque esito positivo.

Nel 2020 sono state avviate le prime prove di germinazione *in vitro* utilizzando i semi di *Saxifraga tombeanensis* campionati nell'estate 2019; trattandosi di specie priva di protocollo di coltivazione *ex situ*, la sperimentazione ha riguardato innanzitutto la definizione della procedura di sterilizzazione superficiale dei semi esaminando in particolare la concentrazione e il tempo di esposizione all'ipoclorito di sodio. Come già detto sopra, questo pre-trattamento è fondamentale per l'avvio della germinazione in vitro in quanto la superficie dei semi è normalmente una fonte di contaminazione: i microrganismi presenti su di essa possono infatti proliferare sul substrato di crescita, compromettendo la vitalità dei semi e/o delle plantule presenti. D'altro canto una sterilizzazione superficiale troppo spinta (i.e. concentrazione e/o tempo di esposizione elevato) può causare la rottura del tegumento del seme, con conseguenti danni all'embrione e perdita di vitalità. Per queste ragioni la prova è stata impostata applicando varie combinazioni di concentrazione e tempo di esposizione all'ipoclorito di sodio, secondo quanto indicato nella seguente tabella:

| Concentrazione % | Tempo di esposizione |
|------------------|----------------------|
| 5%               | 5 minuti             |
| 10%              | 10 minuti            |
|                  | 15 minuti            |
|                  | 30 minuti            |

Una volta sterilizzati in superficie, i semi sono stati seminati *in vitro* in condizioni di sterilità in piastre Petri su di un substrato di coltura come da seguente tabella:

| Ingrediente                     | Quantità                                                 |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Agar                            | 7 g/l                                                    |
| Saccarosio                      | 20 g/l                                                   |
| Sali Murashige and Skoog (1962) | 2,150 g/l (=mezza forza)                                 |
| Carbone attivo                  | 0,5g/l                                                   |
| GA3                             | 250 mg/l (aggiunto tramite sterilizzazione a filtraggio) |

Le piastre Petri sono state mantenute in camera di crescita in condizioni controllate con fotoperiodo di 16/8 ore e temperatura 22/10°C. I controlli periodici sono stati effettuati con cadenza settimanale registrando il numero di semi contaminati e l'eventuale germinazione. I semi non contaminati sono stati trasferiti in nuove piastre identiche alle precedenti immediatamente dopo il conteggio. Data la relativamente scarsa disponibilità di semi, la sperimentazione è stata condotta per il momento solo sul lotto campionato in località Cadria (BS).

L'esame delle piastre Petri ad una settimana dalla semina ha evidenziato la totale assenza di contaminazione. Tuttavia il prosieguo del controllo ha permesso di notare l'emergenza sporadica di contaminazione in corrispondenza di circa il 3% dei semi. La contaminazione è emersa in modo casuale all'interno delle piastre tra il quindicesimo e il ventottesimo giorno

dalla semina, senza che fosse rilevata alcuna differenza statisticamente significativa in base al pre-trattamento (ANOVA:  $F$ -ratio: 1,919,  $p=0,141$ , ns; dati non mostrati): nessun nuovo evento di contaminazione è stato registrato nel corso dei controlli successivi. La dinamica osservata evidenzia fenomeni sporadici e incontrollabili di contaminazione legati alla morfologia dei semi, con particolare riferimento alla struttura del tegumento, in associazione con le modalità di sterilizzazione superficiale e di diffusione dell'acqua nel substrato utilizzato per la coltivazione *in vitro*. Sembra infatti che, a causa delle specifiche caratteristiche dei semi, l'agente sterilizzante non abbia raggiunto completamente tutte le forme microbiche presenti sulla superficie del tegumento, in quanto ad esempio confinate all'interno di micro-fessure poco esposte. Questa loro collocazione ha anche indotto un ritardo nella loro proliferazione, che è avvenuta solo quando sono state raggiunte dall'acqua in diffusione nel substrato. Per queste ragioni, allo stato attuale, la procedura più efficiente di sterilizzazione superficiale dei semi di *Saxifraga tombeanensis* risulta quella meno onerosa, ovvero quella che utilizza ipoclorito di sodio alla concentrazione del 5% con tempo di esposizione pari a 5 minuti. Si deve tuttavia programmare un controllo delle piastre di semina con cadenza almeno settimanale e per i primi 30 giorni, in modo da provvedere tempestivamente alla rimozione dei semi eventualmente contaminati e al rifacimento delle piastre.

Per quanto riguarda la germinazione dei semi di *Saxifraga tombeanensis*, una sperimentazione identica a quella sopra descritta è stata allestita in parallelo. Questa prova ha innanzitutto permesso di rilevare che le modalità di sterilizzazione superficiale non hanno influenze statisticamente significative sul processo di germinazione (ANOVA:  $F$ -ratio: 0,111,  $p=0,988$ , ns; dati non mostrati), processo che appare relativamente lento, con i primi eventi di emersione delle plantule intorno al ventinovesimo giorno. Per questa ragione il test standard, che ha normalmente una durata di 30 giorni, è stato prolungato per un tempo indefinito fino a che non si è osservata la germinazione di alcun seme per un periodo pari ad almeno 15 giorni; l'ultima germinazione, avvenuta il settantasettesimo giorno, ha pertanto definito il termine del test. Il tasso di germinazione finale è risultato in media pari al  $21,67\% \pm 3,48$  con minimo dello 0% e massimo del 66,67%, ma, come detto, senza differenze statisticamente significative.

Date le dimensioni dei semi (peso medio di un seme pari a 0,03 mg), le plantule e le piante nei primi mesi di sviluppo appaiono molto piccole e delicate, sia nella parte subaerea, sia nell'apparato radicale (Figura 31 e 32); non si è potuto pertanto procedere al trasferimento delle stesse in contenitori più grandi sempre *in vitro* in condizioni di sterilità. A distanza di oltre 5 mesi dalla semina, si osserva tuttavia il mancato sviluppo di alcune plantule oltre lo stadio di radichetta + cotiledoni, nonché ridotto accrescimento dell'apparato radicale nelle piante che hanno prodotto foglie vere (Figura 33). Non è chiaro se quest'ultimo fenomeno sia normale per la specie, e saranno quindi necessarie ulteriori sperimentazioni con eventuale utilizzo di ormoni radicanti. Permangono comunque nelle piastre Petri semi del tutto integri e apparentemente vitali.



Figura 31: Plantula di *Saxifraga tombeanensis* a 56 giorni (a sinistra) e a 77 giorni (a destra) dalla semina (foto J. Bellingardi; 03/08/2020 e 24/08/2020).

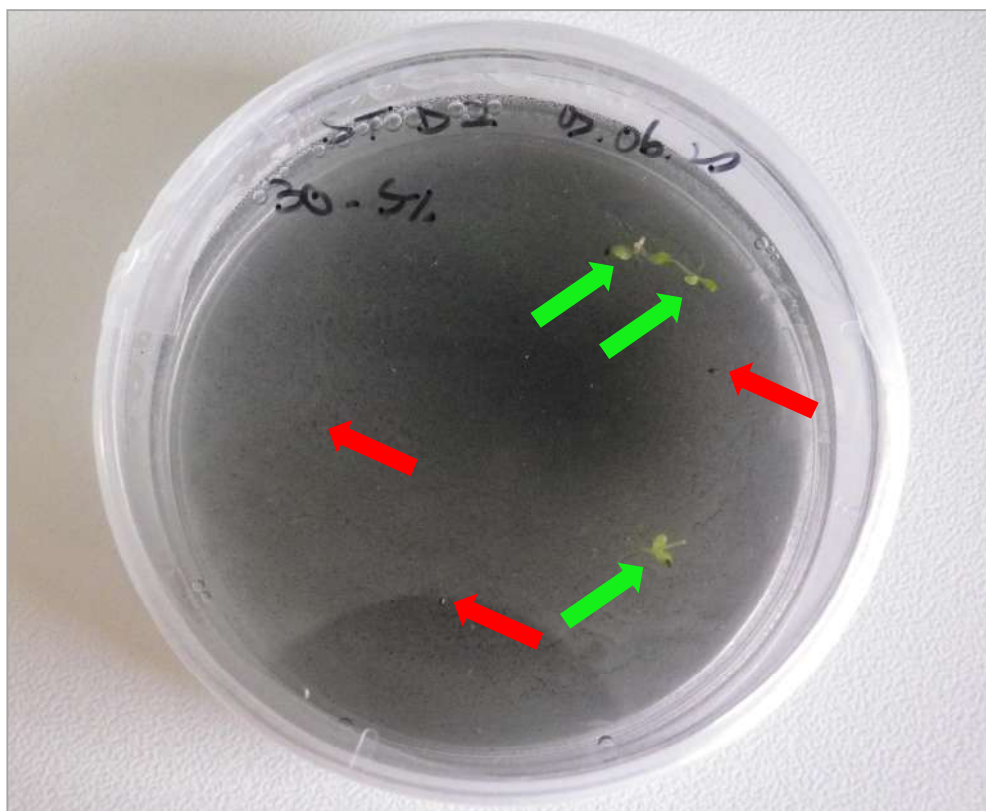


Figura 32: Visione di insieme di una piastra con plantule di *Saxifraga tombeanensis* (frecche verdi) e semi non germinati (frecche rosse). Il diametro della piastra è pari a 5,5 cm (foto J. Bellingardi; e 24/08/2020).

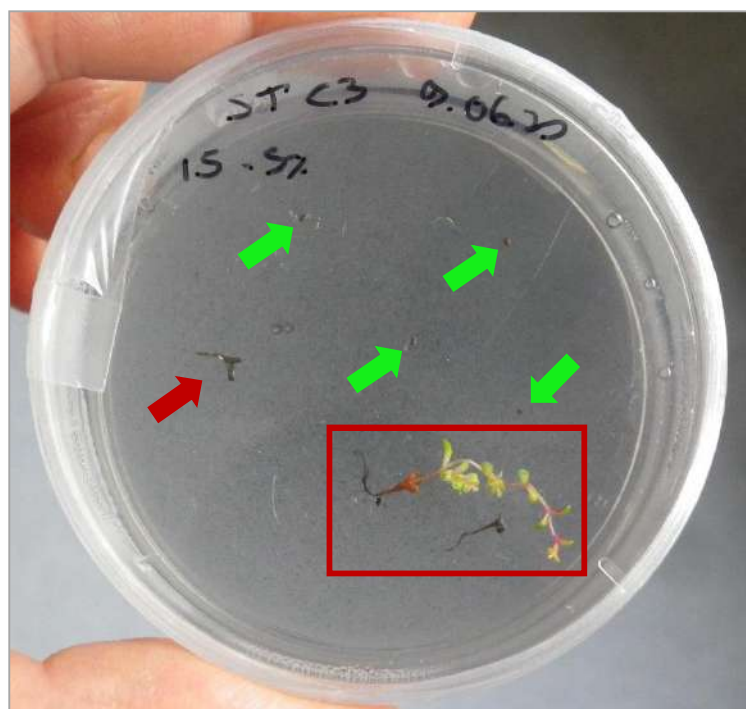


Figura 33: Visione di insieme di una piastra con semi integri non germinati di *Saxifraga tombeanensis* (freccie verdi); plantule non sviluppate oltre lo stadio di radichetta + cotiledoni (freccie rosse), plantula sviluppata con foglie vere (riquadro rosso). Il diametro della piastra è pari a 5,5 cm (foto R.M. Ceriani; 30/11/2020).

## Attività H - Assistenza tecnica e produzione di piante per Display Garden

Questa attività ha previsto per il 2020 l'assistenza all'individuazione dei siti per la realizzazione dei Display Garden, e la successiva partecipazione del personale del CFA, e in particolare della Dott.ssa Roberta M. Ceriani, ai sopralluoghi nelle località prescelte e precisamente:

- Giardino Botanico "Pietra dell'Orsa", Malga Fontaneto, Parco dell'Adamello;
- Località Polveriera, Solaro, Parco delle Groane;
- Località Monte Arera/Plassa, Oltre il Colle, Parco delle Orobie Bergamasche.

I sopralluoghi si sono tenuti rispettivamente nelle date 12.10.2020, 23.10.2020, 26.11.2020. La Dott.ssa Ceriani non ha potuto partecipare all'ultimo sopralluogo in quanto in quarantena fiduciaria in relazione all'emergenza Covid 19, ma ha comunque espresso le proprie considerazioni in merito al sito ubicato nel Parco delle Orobie Bergamasche, alla referente ERSAF Dott.ssa Barbara Cavallaro.

Tralasciando i dettagli sugli esiti dei singoli sopralluoghi, per i quali si rimanda ai relativi verbali, si conferma l'assistenza del CFA per:

- il supporto alla progettazione effettuata dalla Rete degli Orti di Lombardia, per quanto relativo alla scelta delle specie;
- la fornitura di piante di specie inserite nella Direttiva Habitat di cui ai precedenti capitoli, in base alle specificità dei siti e alla disponibilità;
- l'assistenza all'individuazione di aziende agricole, florovivaisti e/o professionisti per la fornitura di piante compatte per il completamento dell'allestimento ove previsto.

## Bibliografia

- ABELI, T., MUCCIARELLI, M., 2010. Notes on the natural history and reproductive biology of *Isoëtes malinverniana*. American Fern Journal, 100: 235-237.
- ARIETTI N., CRESCINI A., 1978. Gli endemismi della flora insubrica. La *Saxifraga tombeanensis* Boiss. ex Engl. Dalla scoperta alla ricostruzione dell'areale. Natura Bresciana, Ann. Mus. Civ. St. Nat., 15: 15-35.
- BARNI, E., MINUZZO, C., GATTO, F., LONATI, F., ABELI, T., AMOSSO, C., SINISCALCO, C., 2013. Estimating influence of environmental quality and management of channels on survival of a threatened endemic quillwort. Aquatic Botany, 107: 39-46.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 1998. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press.
- BRUNI I., GENTILI R., DE MATTIA F., CORTIS P., ROSSI G., LABRA M., 2013. A multi-level analysis to evaluate the extinction risk of and conservation strategy for the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* L. in Europe. Aquatic Botany, 111: 35-42.
- BRUSA G., ARMIRAGLIO S., CERIANI R.M., 2018. Monitoraggio delle specie vegetali della Direttiva 92/43/CEE presenti in Lombardia, a supporto della redazione del IV rapporto ex art. 17. SBI sez. Lombarda, CFA - Regione Lombardia.
- CERABOLINI B., DE ANDREIS R., CERIANI R.M., PIERCE S., RAIMONDI B., 2004. Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. Biological Conservation, 117: 351-356.
- FERRARIO A., CERIANI R.M., 2010. Produzione sperimentale di piante stenoendemiche delle Alpi Orobie. Centro Flora Autoctona. Relazione tecnica inedita.
- GENTILI R., ABELI T., ROSSI G., LI M., VAROTTO C., SGORBATI S., 2010. Population structure and genetic diversity of the threatened quillwort *Isoëtes malinverniana* and implication for conservation. Aquatic Botany, 93/3: 147-152.
- GENTILI R., ROSSI G., LABRA M., SELVAGGI A., GARIBOLDI L., BEDINI G., DALLAI D., PETRAGLIA ALESSANDRO, A. ALESSANDRO, BONAFEDE F., VILLANI C., SGORBATI S., BRUSONI M., 2010. *Marsilea quadrifolia* L. Informatore Botanico Italiano 42/2: 605-609.
- HONG T.D., LININGTON S.H., ELLIS R.H., 1998. Compendium of Information on Seed Storage Behaviour. RBG Kew.
- LINKIES A., GRAEBER K., KNIGHT C., LEUBNER-METZGER G., 2010. The evolution of seeds. New Phytol., 186(4): 817-831.
- MALMGREN S., 1996. Orchid propagation. Theory and practice. In: Allen C, editor. North American native terrestrial orchids. Propagation and production. North American Native Terrestrial Orchid Conference Proceedings. Germantown, MD: C. Allen. pp. 63-71.
- MOLES A.T., ACKERLY D.D., TWEDDLE J.C., DICKIE J.B., SMITH R., LEISHMAN M.R., et al., 2007. Global patterns in seed size. Glob. Ecol. Biogeogr., 16: 109-116.
- PIERCE S., CERIANI R.M., FERRARIO A., CERABOLINI B.E.L. 2019. Germination and cultivation of several Lombardy flagship species: *Aquilegia einseleana*, *Campanula trachelium* and *Linaria tonzigii*. Experiences in seed dormancy and germination. RIBES Series 2. In press.
- PIERCE S., SPADA A., CAPORALI E., CERIANI R.M., BUFFA G., 2018. Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination. Plant Biology, 21: 409-414.
- Puchalski J., Niemczyk M., Walerowski P., Podyma W., Kapler A., 2014. Seed banking of Polish endangered plants in the FlorNatur Project. Biodiv. Res. Conserv., 34: 65-72.
- RAMSEY M.M., 1998. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. Botanical Journal of the Linnean Society, 126: 173-181.
- VEJSADOVÁ H., 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 48/1: 109-113.